

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Filogenia e Evolução de Roedores Echimyidae na Mata Atlântica

Ana Carolina Loss

Vitória, ES
Dezembro, 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Filogenia e Evolução de Roedores Echimyidae na Mata Atlântica

Ana Carolina Loss

Orientador: Yuri Luiz Reis Leite

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Animal) da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Biologia Animal

Vitória, ES
Dezembro, 2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

L881f Loss, Ana Carolina, 1983-
 Filogenia e evolução de roedores Echimyidae na Mata
 Atlântica / Ana Carolina Loss. – 2014.
 139 f. : il.

 Orientador: Yuri Luiz Reis Leite.
 Tese (Doutorado em Biologia Animal) – Universidade
 Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e
 Naturais.

 1. Biogeografia. 2. Filogenia. 3. Rato-de-espinho - Mata
 Atlântica. 4. Evolução (Biologia). I. Leite, Yuri Luiz Reis. II.
 Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências
 Humanas e Naturais. III. Título.

CDU: 57



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO E DOUTORADO EM BIOLOGIA ANIMAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "Filogenia e Evolução de roedores Echimyidae na Mata Atlântica"

AUTORA: ANA CAROLINA LOSS

ORIENTADOR: Prof. Dr. YURI LUIZ REIS LEITE

Aprovada como parte das exigências para obtenção do título de DOUTORA EM BIOLOGIA ANIMAL, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL, pela comissão examinadora:

Dr. YURI LUIZ REIS LEITE
Orientador

Dr^a LEONORA PIRES COSTA
Membro Interno

Dr^a VALÉRIA FAGUNDES
Membro Interno

Dr. RAFAEL DO NASCIMENTO LEITE
Membro Externo

Dr. ALEXANDRE REIS PERCEQUILLO
Membro Externo

DATA DA REALIZAÇÃO: Vitória, 02 de dezembro de 2014.

AGRADECIMENTOS

A defesa de uma tese de doutorado simboliza o fim de uma etapa que representa apenas o início de uma trajetória acadêmica. Para muitos, essa primeira etapa geralmente se inicia ao ingressar na faculdade, no entanto, posso dizer que pra mim ela começou muito antes. Toda criança tem seu pai como um herói, pra mim ele sempre foi, além disso, a pessoa mais inteligente que eu conhecia. Nenhuma pergunta a ele apresentada vinha sem uma resposta genial ou um simples, mas não menos genial: “não sei, mas vamos procurar na BARSÁ!”. Obrigada pai, João Loss, por me ensinar desde cedo o espírito do pesquisador e a nunca aceitar um “não sei” como resposta final. Minha mãe, Maria Domingas Covre Loss, professora da Universidade Federal do Espírito Santo e umas das primeiras mulheres dentistas do estado a concluir o curso de mestrado, me fez conviver com o ambiente acadêmico dos corredores da Universidade e de viagens de congresso muito antes de eu conseguir entender o que isso significava. Obrigada, mãe, por ser um exemplo de perseverança e prestatividade, me mostrando que com esforço e boa vontade, tudo é possível. Aos meus irmãos, Gustavo e Andressa, obrigada pela torcida de sempre.

Ao meu marido, Ernani Vassoler Rodrigues, que literalmente me acompanhou em muitos momentos deste doutorado, muito obrigada pelo apoio incondicional de sempre.

Ao meu orientador, Yuri Luiz Reis Leite, palavras não serão suficientes para expressar todo o respeito, gratidão e admiração que tenho por você. Obrigada por todos os ensinamentos e pela disponibilidade, que sempre foram muito além do que a obrigação de um orientador. Sua dedicação à tarefa de ensinar é inspiradora.

A todos do Laboratório de Mastozoologia e Biogeografia da UFES (LaMaB), muito obrigada pelos bons momentos, pelos trabalhos de campo e congressos sempre divertidos, pela amizade e companheirismo e por me enviarem artigos enquanto eu escrevia a tese de casa. Um agradecimento

especial aos amigos Roger, Jeronymo, Letícia e Rafaela que acompanham essa trajetória desde o início e à Rita Gomes Rocha, pelas discussões científicas, ajuda com as análises e amizade. Ao Jeronymo também pela ajuda com as análises de modelagem de nicho ecológico. À Leonora Pires Costa, muito obrigada pelos ensinamentos, pelo carinho e pela torcida.

A Juliana Justino, Ariel Sessa e Monique Nascimento, funcionários do PPGBAN, muito obrigada pela dedicação de vocês. Nada funcionaria tão bem se não fosse pelo excelente trabalho que vocês desempenham. Obrigada também pela amizade e por toda a ajuda durante esse processo. À Juliana, agradeço em especial pela ajuda no laboratório de biologia molecular e à Monique, pelas horas dedicadas a alíquotar tecidos pra mim.

Ao Rasmus Nielsen, agradeço por me receber em seu laboratório na Universidade da Califórnia, Berkeley, para o estágio sanduiche e a todos os colegas do Nielsen Lab por me acolherem tão bem. Ao Museum of Vertebrate Zoology, na Universidade da Califórnia, agradeço por permitir que eu utilizasse os laboratórios de biologia molecular e toda a estrutura para realizar minha pesquisa. Em especial, agradeço a Jim Patton por toda a ajuda e prestatividade e a Lydia Smith pelos ensinamentos e ajuda com os procedimentos de laboratório.

Agradeço aos pesquisadores Renata Pardini, Raquel Moura, Lena Geise, Paulo Asfora, Sérgio Althoff, Valéria Fagundes, Leonora Costa, Jorge Cherem, Thales O. Freitas, Gislene Gonçalves, Diego Astúa Moraes, Alexandre Christoff, Edson Abreu-Júnior, Alexandre Percequillo, Helena Bergallo, Ana Cláudia Delciellos, Leonardo Lessa, Hugo Mozerle, Anderson Paz, Emerson Vieira, Leonardo Machado e Paulo D'Andrea, pela concessão de tecidos para a realização desse trabalho. A colaboração de cada um de vocês foi imprescindível para a realização desse trabalho.

Agradeço aos curadores Itatí Olivares do Museu de La Plata, na Argentina, João Alves Oliveira do Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro e Cláudia Guimarães Costa do Museu de Ciência Naturais da Pontifícia

Universidade Católica de Minas Gerais, por permitirem retirada de amostras de pele de exemplares tombados para a extração de DNA.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos. À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológicos (CNPq), a Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e a CAPES por fornecerem recuso para subsidiar o desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos pesquisadores que aceitaram compor a banca de defesa, Alexandre Percequillo, Rafael Leite, Valéria Fagundes, Leonora Pires Costa, Albert Ditchfield e Rute Clemente Carvalho agradeço pela disponibilidade de avaliarem e darem suas contribuições para a melhoria desse trabalho.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho e da minha formação acadêmica e que torceram para eu chegasse até aqui.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT.....	9
APRESENTAÇÃO	11
CAPÍTULO 1. Relações filogenéticas inesperadas do rato de espinho <i>Callistomys pictus</i> (Rodentia: Echimyidae)	14
Resumo	15
1. Introdução	16
2. Material e Métodos	17
3. Resultados	19
4. Discussão	20
5. Referências	23
CAPÍTULO 2. Filogenia de <i>Phyllomys</i> (Rodentia: Echimyidae)	27
Resumo	28
1. Introdução	29
2. Material e Métodos	32
2.1. Espécimes.....	32
2.2. Obtenção das sequências de DNA.....	33
2.3. Alinhamento e cálculo da divergência genética	34
2.4. Inferências filogenéticas	35
2.5. Relógio molecular.....	36
3. Resultados	37
3.1. Divergência genética.....	37
3.2. Inferências filogenéticas	38
4. Discussão	44
4.1. Sistemática molecular e taxonomia de <i>Phyllomys</i>	44
4.2. Biogeografia de <i>Phyllomys</i> e tempo de divergência	53
4.3. Irradiação não adaptativa	57
5. Conclusões	59
6. Referências	61
CAPÍTULO 3. Distribuição geográfica e variação genética de <i>Euryzygomatomys spinosus</i> (Rodentia: Echimyidae)	104
Resumo	105
1. Introdução	106
2. Material e Métodos	108
2.1. Localidades de ocorrência	108
2.2. Espécimes e sequências de DNA.....	109
2.3. Alinhamento e análises dos dados moleculares.....	110
3. Resultados	113

3.1. Distribuição geográfica de <i>Euryzgomatomys spinonus</i>	113
3.2. Variação genética e relação entre haplótipos	116
4. Discussão	120
4.1. Distribuição geográfica e ocupação de habitat	120
4.2. Variação genética e sistemática molecular.....	123
5. Conclusões	124
6. Referências	125
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	138

RESUMO

Os roedores Echimyidae tem distribuição Neotropical e são a família mais diversa de roedores Caviomorpha. Apesar da grande diversidade, pouco se sabe sobre a distribuição geográfica, história natural e evolução de vários grupos de equimídeos. O histórico taxonômico dessa família é confuso, sendo alguns grupos raramente coletados e, conseqüentemente, inferências sobre aspectos evolutivos e biológicos são pouco conclusivas e limitadas à análise de poucos exemplares. Filogenias moleculares não corroboram a classificação taxonômica para a família baseada em dados morfológicos, evidenciando a complexidade da história evolutiva desse grupo. Na Mata Atlântica são registrados cinco gêneros de Echimyidae: o rato-do-bambu, *Kannabateomys*; os arborícolas *Phyllomys* e *Callistomys*; o terrestre *Trinomys*, e o semi-fossorial *Euryzygomatomys*. O presente trabalho se baseou na utilização de sequências de DNA para abordar aspectos da evolução e filogenia de roedores equimídeos da Mata Atlântica em três níveis taxonômicos: família, gênero e espécie. O primeiro capítulo aborda a posição filogenética do gênero *Callistomys* dentro da família, utilizando sequências de 1 marcador mitocondrial (CitB) e 3 nucleares (GHR, RAG1 e vWF). Os resultados mostram que *Callistomys* forma um clado com o rato-do-banhado (*Myocastor*), roedor semi-aquático das regiões abertas no cone sul da América do Sul e com o rato-de-espinho terrestre *Proechimys* com ocorrência na Amazônia. Esse clado é irmão de *Thrichomys*, um equimídeo terrestre que ocupa as áreas secas do centro da América do Sul. O agrupamento encontrado é inesperado, uma vez que seus membros apresentam aspectos morfológico, ecológicos e distribuição geográfica distintos e contrastantes. A filogenia resultante indica que *Callistomys* não é proximamente relacionado aos outros equimídeos arborícolas e sugere que o hábito arborícolas evoluiu mais de uma vez na família. O segundo capítulo investiga aspectos da filogenia, evolução e limites entre espécies de *Phyllomys* utilizando dois marcadores mitocondriais (CitB e COI) e três nucleares (GHR, RAG1 e vWF). Foram identificados três grupos principais de espécies: um

com distribuição longitudinal pela porção central da Mata Atlântica (*P. pattoni* (*P. mantiqueirensis*, *Phyllomys* sp. 4)); e a partir daí dois outros grupos, um com distribuição na porção norte da Mata Atlântica (*Phyllomys* sp. 2 (*P. blainvillii* (*P. brasiliensis*, *P. lamarum*))); e outro na porção sul (*Phyllomys* sp. 3 ((*Phyllomys* sp. 1, *P. lundii*), (*Phyllomys* sp. 5 (*P. dasythrix* (*P. nigrispinus* (*P. sulinus*, *Phyllomys* sp. 6)))))). Foram identificadas duas linhagens independentes representando possíveis espécies novas, elevando o potencial número de espécies do gênero de 17 para 19. As filogenias associadas aos dados de distribuição geográfica sugerem que a diversificação e distribuição das espécies de *Phyllomys* foi influenciada pela ação conjunta de vários fatores como atividade neotectônica, gradientes altitudinais e latitudinais e mudanças climáticas que atuaram desde o Mioceno, marcando os primeiros eventos de diversificação do gênero até as especiações mais recentes, no Pleistoceno. O terceiro capítulo avalia a variação genética, distribuição geográfica e status taxonômico da espécie *Euryzygomaotmys spinosus* utilizando dois marcadores mitocondriais (CitB e *D-loop*). Os resultados mostraram que *E. spinosus* apresenta distribuição em áreas de Mata Atlântica e adjacências ao sul do Rio Doce, no Brasil, Paraguai e Argentina, incluindo um registro confirmado no Cerrado. A espécie ocupa habitats muito diversos e pode ser considerada generalista. As populações são geneticamente estruturadas ao longo da sua distribuição e os dados genéticos corroboram a taxonomia atual que considera apenas uma espécie, *E. spinosus*, para o gênero.

Palavras-chave: *Callistomys*, distribuição geográfica, *Euryzygomatomys*, filogenia molecular, *Phyllomys*.

ABSTRACT

The Neotropical rodents of the Echimyidae family are the most diverse among the Caviomorpha clade. Little is known about the geographic range, natural history and evolution of several Echimyidae members, despite its high diversity. The taxonomic history of the family is confusing and some groups are rare in scientific collections, resulting in less conclusive inferences about evolutionary and biological traits, which are based on a few individuals. Molecular phylogenies do not support the taxonomic classification based on morphological traits, highlighting the complexity of the evolutionary history of this group. Five Echimyidae genera occur within the Atlantic Forest range: the bamboo-rat, *Kannabateomys*; the arboreal *Phyllomys* and *Callistomys*; the terrestrial *Trinomys*; and the semi-fossorial *Euryzygomatomys*. In the present study I used DNA sequences to investigate the phylogeny and evolutionary history of three echimyids from the Atlantic Forest at three different taxonomic levels: family, genus, and species. The first chapter investigates the phylogenetic position of *Callistomys* within Echimyidae using sequences of one mitochondrial (CytB) and three nuclear (GHR, RAG1 and vWF) markers. The results show that *Callistomys* forms a clade with the semi-aquatic coypu (*Myocastor*) from the grasslands in the southern South America and terrestrial spiny rats (*Proechimys*) from the Amazon forest. This clade is sister to *Thrichomys*, a terrestrial rat from the dry lands of central South America. These clades are unexpected, given the contrasting morphology, ecology, and geographic ranges of its members. The resulting echimyid phylogeny indicates that *Callistomys* is not closely related to the other arboreal echimyids, and suggest that arboreal habits evolved more than once in this family. The second chapter investigates aspects of the phylogeny, evolution and species limits in the genus *Phyllomys* using two mitochondrial (CytB and COI) and three nuclear (GHR, RAG1 and vWF) markers. Three main species groups were identified: one with a longitudinal distribution through the central portion of the Atlantic Forest (*P. pattoni* (*P. mantiqueirensis*, *Phyllomys* sp. 4)); one

distributed along the northern portion of the Atlantic Forest (*Phyllomys* sp. 2 (*P. blainvillii* (*P. brasiliensis*, *P. lamarum*))) and another along the southern portion (*Phyllomys* sp. 3 ((*Phyllomys* sp. 1, *P. lundii*), (*Phyllomys* sp. 5 (*P. dasythrix* (*P. nigrispinus* (*P. sulinus*, *Phyllomys* sp. 6)))))). Two independent evolutionary lineages were identified, probably representing new species, raising the potential number of *Phyllomys* species from 17 to 19. These phylogenies, together with geographic distribution data, suggest that the diversification and distribution of *Phyllomys* species were affected by the concomitant action of different factors, such as neotectonics, altitudinal and latitudinal gradients, and climate change acting since the Miocene, underlining the first diversifications within *Phyllomys* until more recent speciation events, during the Pleistocene. The third chapter explores the genetic variation, geographic distribution and taxonomic status of the species *Euryzygomatomys spinosus* using two mitochondrial markers (CytB and D-loop). The results show that *E. spinosus* is distributed along the Atlantic Forest and surrounding areas, south of the Rio Doce in Brazil, Paraguay, and Argentina, including a confirmed occurrence in the Cerrado. This species occupies very distinct habitats and may be considered a generalist. The populations are genetically structured along its distribution and the genetic data corroborate the current taxonomy, which considers only one species in the genus, *E. spinosus*.

Keywords: *Callistomys*, *Euryzygomatomys*, geographic distribution, molecular phylogeny, *Phyllomys*.

APRESENTAÇÃO

Os Echimyidae tem distribuição Neotropical e são a família mais diversa de uma das três grandes linhagens de roedores (Ctenohystrica), tanto em relação ao números de táxons quanto de planos corporais (Patterson & Upham, 2014). A diversificação do clado Caviomorpha no continente sul-americano ocorreu durante o Mioceno (Vucetich et al., 1993; Sallam et al., 2009; Fabre et al., 2013), cerca de 15 milhões de anos antes da chegada das outras duas grandes linhagens de roedores, os ratos (Cricetidae) e esquilos (Sciuridae), que vieram da América do Norte em função da consolidação do istmo do Panamá (Patterson & Velazco, 2008; Leite et al., 2014). A ausência de potenciais competidores pode explicar a variedade de nichos ecológicos explorados pelos Echimyidae, podendo ser identificados gêneros com hábito semi-fossorial (e.g., *Euryzygomatomys*, *Clyomys*), terrestre (e.g., *Trinomys*, *Proechimys*), arborícola (e.g., *Phyllomys*, *Callistomys*, *Echimys*) e semi-aquático (*Myocastor*) distribuídos ao longo de diferentes regiões neotropicais, desde áreas florestadas úmidas (e.g., Mata Atlântica, Amazônia, Andes) até abertas e secas (e.g., Caatinga, Cerrado).

Apesar da grande diversidade, pouco se sabe sobre a distribuição geográfica, história natural e evolução de vários grupos de roedores equimídeos. O histórico taxonômico da família, assim como de vários gêneros, é confuso e apesar de várias revisões importantes de grupos específicos (e.g., Patton & Emmons, 1985; Emmons & Vucetich, 1998; Lara & Patton, 2000; Leite, 2003; Emmons, 2005), ainda existem grandes lacunas de estudos sistemáticos, principalmente no nível intragenérico. Alguns grupos são raramente coletados e, conseqüentemente, inferências sobre aspectos evolutivos e biológicos são pouco conclusivas e limitadas à análise de poucos exemplares. Apesar de tradicionalmente serem reconhecidas três subfamílias viventes de Echimyidae: Eumysopinae, Echimyinae e Dactylomyinae (Woods & Kilpatrick, 2005), filogenias reconstituídas tanto com dados moleculares quanto morfológicos não recuperam

as duas primeiras subfamílias como monofiléticas (Carvalho & Salles, 2004; Emmons, 2005; Olivares & Verzi, 2014). Além disso, outros roedores tradicionalmente alocados em suas próprias famílias, como Myocastoridae e Capromyidae, vêm sendo recuperados dentro da família Echimyidae (Galewski et al., 2005; Fabre et al., 2013).

Na Mata Atlântica são registrados cinco gêneros de Echimyidae, três deles monotípicos, o rato-do-bambu *Kannabateomys amblyonyx*, o rato-do-cacau *Callistomys pictus* e o guiara *Euryzygomatomys spinosus*; e dois mais diversos, o arborícola *Phyllomys* e o terrestre *Trinomys*. O presente trabalho utiliza sequências de DNA de genes nucleares e mitocondriais para abordar aspectos da sistemática, evolução e filogenia de três desses roedores equimídeos da Mata Atlântica (Figura 1) em três níveis hierárquicos. O primeiro capítulo aborda a posição filogenética do gênero *Callistomys* na família Echimyidae. O segundo capítulo investiga as relações filogenéticas entre as espécies do gênero *Phyllomys* e o terceiro avalia a variação genética ao longo da distribuição geográfica de *Euryzygomaotmys spinosus*.



Figura 1. Echimyidae da Mata Atlântica, representando os três táxons abordados no presente estudo. A, *Callistomys pictus*; B, *Euryzygomatomys spinosus*; C, *Phyllomys thomasi*.

Referências

- Carvalho G.A.S. & Salles L.O. (2004) Relationships among extant and fossil Echimyids (Rodentia: Hystricognathi). *Zoological Journal of the Linnean Society*, **142**, 445–477.
- Emmons L.H. (2005) A revision of the genera of arboreal Echimyidae (Rodentia: Echimyidae, Echimyinae) with the description of two new genera. *Mammalian Diversification: From Chromosomes to Phylogeography (A Celebration of the Career of James L. Patton)* (ed. by E.A. Lancey and P. Myers), pp. 247–309. University of California Press, Berkeley.
- Fabre P.-H., Galewski T., Tilak M., & Douzery E.J.P. (2013) Diversification of South American spiny rats (Echimyidae): a multigene phylogenetic approach. *Zoologica Scripta*, **42**, 117–134.
- Galewski T., Mauffrey J.-F., Leite Y.L.R., Patton J.L., & Douzery E.J.P. (2005) Ecomorphological diversification among South American spiny rats (Rodentia; Echimyidae): a phylogenetic and chronological approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **34**, 601–615.
- Leite R.N., Kolokotronis S.-O., Almeida F.C., Werneck F.P., Rogers D.S., & Weksler M. (2014) In the wake of invasion: tracing the historical biogeography of the South American cricetid radiation (Rodentia, Sigmodontinae). *PloS one*, **9**, e100687.
- Olivares A.I. & Verzi D.H. (2014) Systematics, phylogeny and evolutionary pattern of the hystricognath rodent *Eumysops* (Echimyidae) from the Plio–Pleistocene of southern South America. *Historical Biology: an International Journal of Paleobiology*, 1–20.
- Patterson B.D. & Upham N.S. (2014) A study in contrasts: two extensive Neotropical radiations. *BMC Evolutionary Biology*, **2**, 1–2.
- Sallam H.M., Seiffert E.R., Steiper M.E., & Simons E.L. (2009) Fossil and molecular evidence constrain scenarios for the early evolutionary and biogeographic history of hystricognathous rodents. *PNAS*, **106**, 16722–7.
- Vucetich M.G., Mazzoni M.M., & Pardiñas U.F.J. (1993) Los roedores de la Formación Collón Curá (Mioceno medio), y la Ignimbrita Pilcaniyeu. Cañadón del Tordillo, Neuquen. *Ameghiniana*, **30**, 361–381.

CAPÍTULO 1

Relações filogenéticas inesperadas do rato de espinho *Callistomys*
pictus (Rodentia: Echimyidae)

Resumo

Callistomys pictus é um roedor equimídeo arborícola e o único representante vivente do seu gênero. É endêmico de uma região restrita na Mata Atlântica, no estado da Bahia, leste do Brasil. No presente trabalho utilizamos sequências de 4 genes para inferir a posição filogenética de *Callistomys* na família Echimyidae. Os resultados mostram que *Callistomys* forma um clado com o rato-do-banhado semi-aquático (*Myocastor*) das regiões abertas no cone sul da América do Sul e com o rato-de-espinho terrestre *Proechimys* com ocorrência na Amazônia. Esse clado é irmão de *Thrichomys*, um equimídeo terrestre que ocupa as áreas secas do centro da América do Sul. O agrupamento encontrado é inesperado, uma vez que seus membros apresentam aspectos morfológico, ecológicos e distribuição geográfica distintos e contrastantes. A filogenia resultante para a família Echimyidae indica que *Callistomys* não é proximamente relacionado aos outros equimídeos arborícolas e sugere que o hábito arborícolas evoluiu mais de uma vez nessa família.

Palavras-chave: endemismo; evolução; filogenia molecular, Mata Atlântica.

1. Introdução

Os Echimyidae, ou ratos-de-espinhos da América do Sul, representam a maior radiação atual dos roedores Caviomorpha, com aproximadamente 23 gêneros e 90 espécies viventes (Fabre et al., 2013). Roedores desta família estão distribuídos ao longo de diferentes regiões do neotrópico, desde áreas florestadas úmidas (e.g., Mata Atlântica, Amazônia, Andes) até abertas e secas (e.g. Caatinga, Cerrado), apresentando adaptações a modos de vida distintos, como semi-fossorial (e.g., *Euryzygomatomys*, *Clyomys*), terrestre (e.g., *Trinomys*, *Proechimys*), arborícola (e.g., *Callistomys*, *Echimy*) e semi-aquático (*Myocastor*).

Callistomys pictus Pictet, 1843, o rato-do-cacau, é a única espécie vivente do gênero arborícola *Callistomys* (Emmons & Vucetich, 1998). Apresenta distribuição limitada a uma área restrita de Mata Atlântica no sul da Bahia (Vaz, 2002; Ventura et al., 2008), sendo considerado ameaçado de extinção pela IUCN (*International Union for Conservation of Nature and Natural Resources*; Moura & Fonseca, 2008). O gênero é classificado na subfamília Echimyinae (Emmons 2005), que abrange outros gêneros arborícolas distribuídos ao longo de diversas regiões de floresta das Américas Central e do Sul. As outras três subfamílias de equimídeos são: Dactylomyinae (ratos-do-bambu), Eumysopinae (ratos-de-espinhos terrestres ou semi-fossoriais), e Heteropsomyinae (ratos das Antilhas, recentemente extintos) (Woods & Kilpatrick, 2005). No entanto, várias análises filogenéticas além de não recuperarem a monofilia das subfamílias, também indicam que roedores tradicionalmente alocados nas suas próprias famílias—o rato-do-banhado semi-aquático (Myocastoridae) e os caviomorfos caribenhos (Capromyidae)—geralmente são recuperados dentro do clado dos equimídeos (Leite & Patton, 2002; Carvalho & Salles, 2004; Galewski et al., 2005; Fabre et al., 2013).

Análises filogenéticas feitas com caracteres morfológicos recuperaram

Callistomys em um clado com outras espécies arborícolas, incluindo os ratos-do-bambu e os outros gêneros arborícolas da subfamília Echimyinae (Carvalho & Salles, 2004; Emmons, 2005). Filogenias recentes inferidas a partir de sequências de DNA confirmaram a proximidade filogenética entre equimídeos arborícolas, formando um grupo monofilético (Fabre et al., 2013), no entanto, *Callistomys* ainda não foi incluído em nenhuma análise filogenética molecular. Sendo assim, nosso objetivo foi inferir a posição filogenética de *Callistomys* a partir de sequências de DNA e discutir o significado evolutivo e biogeográfico do resultado encontrado.

2. Material e Métodos

Uma fêmea de *Callistomys pictus* foi capturada por R. Moura (número de campo RM 233) na Fazenda Norma, Rio do Braço, município de Ilhéus, Bahia (39°16'30" O, 14° 40'56" S), e seguida por rádio-collar até ser encontrada morta em outubro de 2003. O material genético foi isolado a partir de uma amostra de fígado fixada em etanol, utilizando protocolo de sal para extração total do DNA (SDS / NaCl / Proteinase K) descrito por Bruford et al. (1992). O conjunto de dados utilizado para reconstruir a hipótese filogenética consiste em fragmentos de 4 genes: mitocondrial citocromo b (CitB), exon 28 do fator de von Willebrand (vWF), exon 10 do receptor de hormônio do crescimento (GHR), gene ativador da recombinase (RAG1), totalizando 3.810 pares de base (pb) por indivíduo de 14 gêneros de Echimyidae (*Callistomys*, *Capromys*, *Clyomys*, *Dactylomys*, *Echimyis*, *Euryzygomatomys*, *Isothrix*, *Makalata*, *Mesomys*, *Myocastor*, *Phyllomys*, *Proechimys*, *Thrichomys*, *Trinomys*). *Octodon* e *Ctenomys* foram utilizados como grupos externos. Espécimes utilizados no presente estudo e respectivos número de acesso do GenBank estão listados no Apêndice 1.

Os fragmentos de interesse foram amplificados através de clonagem *in vitro* pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando a seguinte combinação de *primers*: MVZ05 e MVZ16 (Smith & Patton, 1993) para CitB; V10, W13 (Galewski et al., 2005), V2 e W1 (Huchon et al., 1999) para vWF; GHREND, GHR50F (Adkins et al., 2001), GHR10F, GHR11F e GHR14R (Upham et al., 2013) para GHR e RAG1F1705, RAG1R2864 (Teeling et al., 2000), FMNH2b e FMNH3a (Patterson & Velazco, 2008) para RAG1. As amostras foram sequenciadas nas duas direções em sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems) seguindo protocolo do fabricante para a reação de sequenciamento. As sequências foram alinhadas no Geneious 5.6 (Biomatters) e foi realizado o teste de Xia et al. (2003) no DAMBE5 (Xia, 2013) para detectar saturação de substituições nas diferentes posições dos códons. Os modelos de evolução para cada partição foram determinados no jModelTest 2.1.4 (Guindon & Gascuel, 2003; Darriba et al., 2012), permitindo três esquemas de substituição e utilizando o critério de informação de Akaike corrigido (AICc).

Foi detectada saturação apenas para a terceira posição do CitB, sendo as sequências deste marcador particionadas em dois conjuntos de dados: um incluindo as primeira e segunda posições do códon, e outro incluindo apenas a terceira posição. Os modelos de evolução selecionados para cada partição foram: 1) GTR (*general time reversible*) + I (proporção de sítios invariáveis) + G (gama) para primeira e segunda posição do CitB, e para vWF; 2) GTR + G para a terceira posição do CitB, e para GHR; e 3) TRN (Tamura-Nei) + I + G para o RAG1. A hipótese filogenética foi construída a partir de uma matriz com todos os dados particionados utilizando o critério Bayesiano de otimização implementado no MrBayes 3.2 (Ronquist et al., 2012), com 10^6 gerações, amostrando uma árvore a cada 500 gerações, resultando em 2×10^3 árvores. As 25 % primeiras árvores foram descartadas para a construção do consenso. As análises foram repetidas independentemente cinco vezes a fim de se evitar a ocorrência de ótimos locais. Foram considerados significativos somente grupos com valores de probabilidade

posterior Bayesiana (PPB) maiores ou iguais a 95 %.

Hipóteses filogenéticas alternativas encontradas para a posição de *Callistomys* foram testadas usando o teste de aproximação sem viés (*approximately unbiased test*) proposto por Shimodaira (2002) e implementado no programa CONSEL (Shimodaira & Hasegawa, 2001). Para tanto, os valores de máxima verossimilhança de cada sítio foram calculados no PAUP* v4.0b10 (Swofford, 2002) assumindo o modelo de evolução apropriado para cada partição.

3. Resultados

Callistomys foi recuperado com suporte estatístico em um clado que inclui também *Myocastor*, de hábito semi-aquático e *Proechimys*, de hábito terrestre, formando uma politomia (Figura 1).

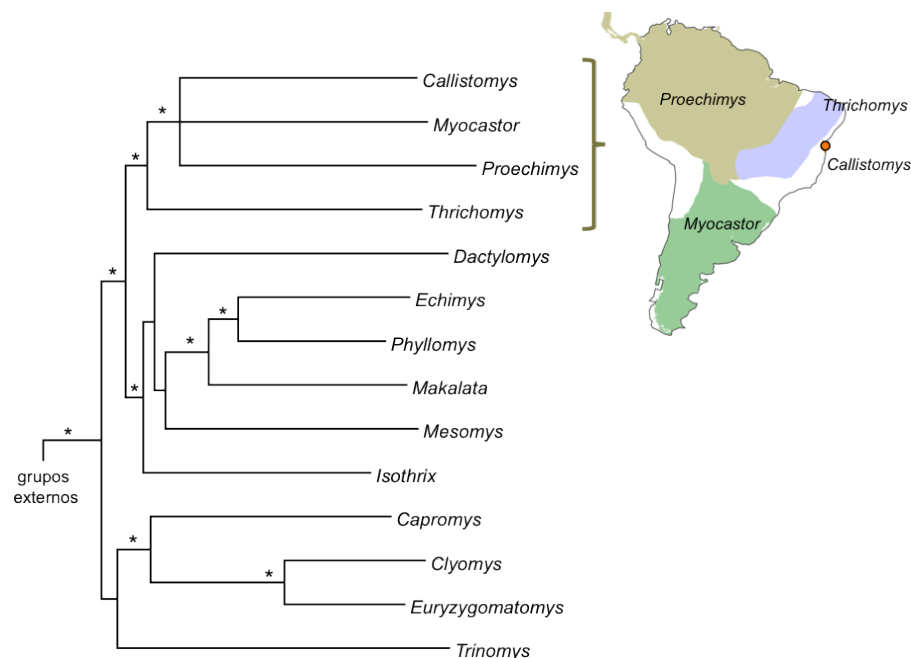


Figura 1. Filogenia Bayesiana de roedores Echimyidae construída com quatro marcadores moleculares (CitB, vWF, GHR e RAG1). Asteriscos indicam nós com suporte estatístico (probabilidade posterior Bayesiana ≥ 95). O mapa indica área de distribuição de *Callistomys* e gêneros filogeneticamente próximos.

O teste de topologia não rejeitou nenhuma das três hipóteses alternativas de relação para a politomia: *Callistomys* mais próximo de *Myocastor* ou de *Proechimys*, ou *Proechimys* mais próximo de *Myocastor*. O clado *Callistomys* + *Myocastor* + *Proechimys* é irmão de *Thrichomys*, de hábito terrestre, formando um clado mais inclusivo, irmão de um outro clado que abrange também os demais taxa arborícola, incluindo os “Echimyinae” (parafilético) e os ratos-do-bambu (*Dactylomyinae*) (Figura 1).

4. Discussão

A mais recente filogenia molecular proposta para Echimyidae (Fabre et al., 2013) apresente três principais clados: um formado por gêneros terrestres e semi-aquático (*Thrichomys*, *Myocastor*, *Proechimys* e *Hoplomys*); outro por gêneros arborícolas (*Mesomys*, *Lonchothrix*, *Makalata*, *Phyllomys*, *Echimys*, *Isothrix*, *Kannabateomys* e *Dactylomys*); e um terceiro grupo formado por gêneros semi-fossoriais, terrestre e escansorial (*Euryzygomatomys*, *Clyomys*, *Trinomys* e *Capromys*). Fabre et al. (2013) sugerem que a discrepância repetidamente encontrada entre filogenias moleculares e morfológicas para equimídeos pode ser devido a abundância de caracteres plesiomórficos nos dados morfológicos. Os autores também apontam que a diversificação da família pode ter sido dirigida primeiramente por ocupações de habitat distintos, seguida por divergência morfológica e finalmente uma irradiação adaptativa deu origem a linhagem arborícola.

Dentre os 23 gêneros de Echimyidae, 14 são arborícolas. Todas as hipóteses filogenéticas baseadas em dados moleculares já propostas para a família, indicaram uma monofilia de gêneros com adaptações à vida arbórea (Galewski et al., 2005; Fabre et al., 2013; Upham et al., 2013). Hipóteses

filogenéticas construídas com dados morfológicos alocaram *Callistomys* em um clado com outros equimídeos arborícolas (Carvalho & Salles, 2004; Candela & Rasia, 2012), no entanto, a posição filogenética de *Callistomys* encontrada no presente estudo, fora do clado arborícola e agrupado com gêneros terrestres e semi-aquático, indica que equimídeos arborícolas são parafiléticos e sugere que o hábito arborícola e suas adaptações morfológicas correspondentes, surgiram mais de uma vez durante a história evolutiva da família (contra Carvalho & Salles, 2004).

Taxonomicamente, *Callistomys* é considerado um membro da subfamília Echimyinae (e.g., Woods & Kilpatrick, 2005), mas Emmons & Vucetich (1998) já haviam chamado atenção para o fato de que o gênero apresenta caracteres morfológicos intermediários entre as subfamílias Eumysopinae e Echimyinae. Os dados genéticos disponíveis indicam que ambas são parafiléticas (Upham & Patterson, 2012; Fabre et al., 2013), um resultado também confirmado pelos dados moleculares do presente estudo, incluindo *Callistomys* pela primeira vez.

Os quatro gêneros recuperados em um mesmo clado nas análises genéticas do presente trabalho apresentaram características ecológicas muito distintas e quase nenhuma sobreposição de distribuição geográfica (Figura 1). O arborícola *Callistomys* tem distribuição restrita na Mata Atlântica do leste do Brasil; o semi-aquático *Myocastor* ocorre em áreas abertas do sul da América do Sul, indo da Bolívia até a Terra do Fogo; o terrestre *Proechimys* é amplamente distribuído em terras baixas da floresta Amazônica e habitat adjacentes, se estendendo até a América Central; e o terrestre *Thrichomys* ocorre em florestas secas e áreas abertas da Caatinga e Cerrado no Brasil Central, e partes adjacentes no Paraguai e Bolívia. Apesar de apresentar distribuição muito restrita atualmente, a área de ocorrência de *Callistomys* se estendia mais de 700 km a sudoeste no Pleistoceno tardio ao início do Holoceno (Emmons & Vucetich, 1998).

O tempo de diversificação do clado *Callistomys* + *Myocastor* + *Proechimys*

é estimado há cerca de 15 milhões de anos (Fabre et al., 2013), o que sugere que próximo dessa época essas linhagens ocupavam áreas próximas. A discrepância entre áreas de ocorrência atuais dos táxons e deslocamento ao longo do tempo ilustram que a distribuição geográfica atual não necessariamente reflete o histórico de diversificação do grupo e pode esclarecer pouco sobre os habitats ocupados pelas linhagens ancestrais, especialmente as mais antigas. Uma das principais limitações das inferências evolutivas baseadas em filogenia moleculares é a ausência de táxons fósseis, nesse caso podemos citar gêneros extintos, filogeneticamente próximos a *Callistomys* e *Myocastor*, como *Maruchito* e *Tramyocastor* (Carvalho & Salles, 2004; Candela & Rasia, 2012). Apesar dessas limitações, os resultados apresentados aqui indicam que os táxons vivos filogeneticamente próximos de *Callistomys* não estão na Mata Atlântica, e apresentam caracteres morfológicos e adaptações ecológicas muito distintas, chamando atenção para a natureza dinâmica da evolução e biogeografia dos equimídeos.

5. Referências

- Adkins R.M., Gelke E.L., Rowe D., & Honeycutt R.L. (2001) Molecular phylogeny and divergence time estimates for major rodent groups: evidence from multiple genes. *Molecular Biology and Evolution*, **18**, 777–791.
- Bruford M.W., Hanotte O., Brookfield J.F.Y., & Burke T. (1992) Single-locus and DNA fingerprinting. *Molecular genetic analyses of populations. A Practical Approach* (ed. by A.R. Hoelzel), pp. 225–269. IRL Press, Oxford.
- Candela A.M. & Rasia L.L. (2012) Tooth morphology of Echimyidae (Rodentia, Caviomorpha): homology assessments, fossils, and evolution. *Zoological Journal of the Linnean Society*, **164**, 451–480.
- Carvalho G.A.S. & Salles L.O. (2004) Relationships Among Extant and Fossil Echimyids (Rodentia: Hystricognathi). *Zoological Journal of the Linnean Society*, **142**, 445–477.
- Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., & Posada D. (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, **9**, 772.
- Emmons L.H. (2005) A revision of the genera of arboreal Echimyidae (Rodentia: Echimyidae, Echimyinae) with the description of two new genera. *Mammalian Diversification: From Chromosomes to Phylogeography (A Celebration of the Career of James L. Patton)* (ed. by E.A. Lancey and P. Myers), pp. 247–309. University of California Press, Berkeley.
- Emmons L.H. & Vucetich M.G. (1998) The Identity of Winge's *Lasiuromys villosus* and the Description of a New Genus of Echimyid Rodent (Rodentia: Echimyidae). *American Museum Novitates*, **3223**, 1–12.
- Fabre P.-H., Galewski T., Tilak M., & Douzery E.J.P. (2013) Diversification of South American spiny rats (Echimyidae): a multigene phylogenetic approach. *Zoologica Scripta*, **42**, 117–134.
- Galewski T., Mauffrey J.-F., Leite Y.L.R., Patton J.L., & Douzery E.J.P. (2005) Ecomorphological diversification among South American spiny rats (Rodentia; Echimyidae): a phylogenetic and chronological approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **34**, 601–615.
- Guindon S. & Gascuel O. (2003) A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology*, **52**, 696–704.
- Huchon D., Catzeflis F.M., & Douzery E.J. (1999) Molecular evolution of the

- nuclear von Willebrand factor gene in mammals and the phylogeny of rodents. *Molecular biology and evolution*, **16**, 577–589.
- Leite Y.L.R. & Patton J.L. (2002) Evolution of South American spiny rats (Rodentia, Echimyidae): the star-phylogeny hypothesis revisited. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **25**, 455–464.
- Moura R.T. & Fonseca G.A.B. (2008) Disponível em: www.iucnredlist.org.
- Patterson B.D. & Velazco P.M. (2008) Phylogeny of the rodent genus *Isothrix* (Hystricognathi, Echimyidae) and its diversification in Amazonia and the eastern Andes. *Journal of Mammalian Evolution*, **15**, 181–201.
- Ronquist F., Teslenko M., van der Mark P., Ayres D.L., Darling A., Höhna S., Larget B., Liu L., Suchard M.A., & Huelsenbeck J.P. (2012) MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, **61**, 539–542.
- Shimodaira H. (2002) An approximately unbiased test of phylogenetic tree selection. *Systematic Biology*, **51**, 492–508.
- Shimodaira H. & Hasegawa M. (2001) CONSEL: for assessing the confidence of phylogenetic tree selection. *Bioinformatics*, **17**, 1246–1247.
- Smith M.F. & Patton J.L. (1993) The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine tribe. *Biological Journal of the Linnean Society*, **50**, 149–177.
- Swofford D.L. (2002) PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and others methods). .
- Teeling E.C., Scally M., Kao D.J., Romagnoli M.L., Springer M.S., & Stanhope M.J. (2000) Molecular evidence regarding the origin of echolocation and flight in bats. *Nature*, **403**, 188–192.
- Upham N.S., Ojala-Barbour R., Brito M J., Velazco P.M., & Patterson B.D. (2013) Transitions between Andean and Amazonian centers of endemism in the radiation of some arboreal rodents. *BMC Evolutionary Biology*, **13**, 1–24.
- Upham N.S. & Patterson B.D. (2012) Diversification and biogeography of the Neotropical caviomorph lineage Octodontoidea (Rodentia: Hystricognathi). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **63**, 417–29.
- Vaz S.M. (2002) Sobre a ocorrência de *Callistomys pictus* (Pictet) (Rodentia,

- Echimyidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, **19**, 631–635.
- Ventura K., lack-Ximenes G.E., Pardini R., Sousa M.A.N. de, Yonenaga-Yassuda Y., & Silva M.J. de J. (2008) Karyotypic analyses and morphological comments on the endemic and endangered Brazilian painted tree rat *Callistomys pictus* (Rodentia, Echimyidae). *Genetics and Molecular Biology*, **31**, 697–703.
- Woods C.A. & Kilpatrick C.W. (2005) Suborder Hystricognathi. *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference* (ed. by D.E. Wilson and D.M. Reeder), pp. 1538–1600. Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Xia X. (2013) DAMBE5: A comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Molecular Biology and Evolution*, **30**, 1720–1728.
- Xia X., Xie Z., & Li W.H. (2003) Effects of GC content and mutational pressure on the lengths of exons and coding sequences. *Journal of Molecular Evolution*, **56**, 362–370.

Apêndice 1. Códigos de acesso do GenBank das amostras utilizadas no presente trabalho, os códigos correspondem respectivamente as sequências de CitB, GHR, RAG1 e vWF.

Echimyidae: *Callistomys pictus* [KJ742659, KJ742627, KJ742677, KJ742614]; *Capromys pilorides* [AF422915, AF433950, JX515322, AJ251142]; *Clyomys laticeps* [AF422918, JX515326, KJ742679, AJ849306]; *Dactylomys boliviensis* [L23339, JX515334, EU313298, AJ849307]; *Echimys chrysurus* [L23341, JX515333, EU313303, AJ251141]; *Euryzygomatomys spinosus* [EU544667, JX515327, KJ742680, AJ849319]; *Isothrix bistrata* [L23355, JX515336, EU313305, AJ849308]; *Makalata didelphoides* [EU302692, JX515332, EU313315, AJ849311]; *Mesomys hispidus* [L23385, JX515335, EU313322, AJ849305]; *Myocastor coypus* [EU544663, AF520662, AY011892, AJ251140]; *Phyllomys blainvillii* [EF608180, JX515331, JX515323, AJ849314]; *Proechimys simonsi* [EU313249, JX515324, EU313332, AJ849320]; *Thrichomys apereoides* [EU544668, JX515325, EU313334, AJ849315]; *Trinomys iheringi* [EU544664, KF590695, EU313337, KF590677].

Grupos Externos*: *Octodon* [AM407929, AF520650, XM004627038, AJ238386]; *Ctenomys* [AF370703, AF520656, KM514671, AJ251138].

* Para representar os gêneros dos grupos externos foram utilizadas sequências de espécies diferentes, resultando em unidades taxonômicas operacionais quiméricas. Para *Octodon* foram utilizadas sequências de CitB e RAG1 de *O. degus*, e sequências de GHR e vWF de *O. lunatus*. Para *Ctenomys*, foram utilizadas sequências de CitB e vWF de *C. maullinus*, sequências de GHR de *C. steinbachi*, e sequências de RAG1 de *C. bicolor*.

CAPÍTULO 2

Filogenia de *Phyllomys* (Rodentia: Echimyidae)

Resumo

Phyllomys é um gênero de roedores Echimyidae arborícolas endêmico da Mata Atlântica brasileira, considerado raro e pouco representado em coleções científicas. Atualmente são reconhecidas 13 espécies viventes e 4 potenciais espécies novas ainda não descritas no gênero. O objetivo do presente trabalho foi elucidar aspectos da filogenia, evolução e limites entre espécies de *Phyllomys* utilizando sequências de dois genes mitocondriais (CitB e COI) e três nucleares (GHR, RAG1 e vWF) de 12 linhagens distintas. Foram identificados três grupos principais de espécies: um com distribuição longitudinal pela porção central da Mata Atlântica (*P. pattoni* (*P. mantiqueirensis*, *Phyllomys* sp. 4)); e a partir daí dois outros grupos, um com distribuição na porção norte da Mata Atlântica (*Phyllomys* sp. 2 (*P. blainvillii* (*P. brasiliensis*, *P. lamarum*))); e outro na porção sul (*Phyllomys* sp. 3 ((*Phyllomys* sp. 1, *P. lundî*), (*Phyllomys* sp. 5 (*P. dasythrix* (*P. nigrispinus* (*P. sulinus*, *Phyllomys* sp. 6)))))). A identificação de duas linhagens independentes, *Phyllomys* sp.5 e sp.6, elevando o potencial número de espécies do gênero de 17 para 19, incita uma revisão dos limites de distribuição geográfica e caracteres diagnósticos de *P. sulinus*, *P. nigrispinus*, *P. lamarum* e *P. blainvillii*. As filogenias associadas a dados de distribuição geográfica sugerem que a diversificação e distribuição das espécies de *Phyllomys* foi influenciada pela atividade neotectônica, gradientes altitudinais e latitudinais e mudanças climáticas que atuaram desde o Mioceno, marcando os primeiros eventos de diversificação do gênero até as especiações mais recentes, no Pleistoceno.

Palavras-chave: biogeografia; evolução; filogenia molecular; Mata Atlântica; sistemática molecular.

1. Introdução

O gênero *Phyllomys* foi descrito por Lund em 1839 e compreende espécies arborícolas de pequeno a médio porte, com hábito noturno e distribuição restrita a áreas de Mata Atlântica brasileira, presente inclusive em enclaves de mata na Caatinga (Moojen, 1952; Leite, 2003). Representa a linhagem atual mais diversa dentre os Echimyidae arborícolas, com 13 espécies viventes descritas além de 4 linhagens independentes que representam potenciais espécies novas ainda não descritas (Loss & Leite, 2011; Araújo et al., 2013). Apesar de sua distribuição ser praticamente restrita à Mata Atlântica, estudos morfológicos e moleculares apontam o gênero amazônico arborícola *Echimy*s como grupo irmão de *Phyllomys* (Galewski et al., 2005; Fabre et al., 2013; Verzi et al., 2013).

Historicamente, *Phyllomys* foi classificado como *Nelomys* ou incluído dentro de *Echimy*s. Apesar do nome *Phyllomys* ter sido aplicado corretamente por Moojen (1952) no clássico livro “Os Roedores do Brasil”, o autor não explicou o porquê do seu uso e *Nelomys* continuou sendo amplamente empregado (e.g., Cabrera 1961; Emmons & Feer 1990; 1997; Olmos 1997). A primeira revisão taxonômica do grupo foi publicada por Emmons et al. (2002), onde os autores esclarecem que, apesar de *Nelomys* ser mais antigo que *Phyllomys*, esse é sinônimo júnior de *Echimy*s, sendo portanto *Phyllomys* o próximo nome disponível.

Pouco se sabe sobre a ecologia e história natural dos *Phyllomys*. Leite (2003) ressaltou que o número de informações era muito pequeno para permitir qualquer tipo de análise estatística, sendo, em sua maioria, provenientes de observações pontuais. Tais observações sugerem que os *Phyllomys* apresentam um ninhada pequena, variando de um a dois filhotes que nascem precoces. Observações de campo e de coleções científicas indicam que eles podem perder a cauda, comportamento provavelmente associado ao mecanismo de fuga de

predadores (Shargal et al., 1999; Vaughan et al., 2014) presente na maioria dos equimídeos. São herbívoros, alimentando-se principalmente de folhas e apresentam morfologia compatível com hábito arborícola, com cauda longa, membros traseiros relativamente curtos, unhas robustas, orelhas pequenas e vibrissas longas. Apresentam crescimento indeterminado (Leite, 2003), assim como outros Echimyidae (Patton & Rogers, 1983; Patton et al., 2000).

Exemplares de *Phyllomys* são relativamente raros em coleções científicas, o que levanta a questão se eles são também raros na natureza ou pouco coletados devido ao uso de métodos de captura pouco eficientes. Das 12 espécies de *Phyllomys* presentes na lista vermelha de espécies ameaçadas da *International Union for Conservation of Nature and Natural Resources* (IUCN, <http://discover.iucnredlist.org>), apenas 5 delas são consideradas de baixo risco, enquanto 5 são classificadas como em perigo ou criticamente em perigo e as informações são insuficientes para determinar o *status* de conservação de outras 2. Algumas espécies são conhecidas por menos de uma dezena de exemplares e a carência de estudos a respeito do grupo é um reflexo da falta de representantes em coleções científicas, da falta de informações precisas sobre localidades de coleta e da preservação de apenas algumas partes (e.g., só a pele, sem o crânio) de alguns exemplares importantes, como holótipos.

Phyllomys kerri é conhecido por somente três exemplares coletados em 1941, todos na mesma localidade em Ubatuba, São Paulo. *Phyllomys lundii* é conhecido apenas por dois exemplares e *P. mantiqueirensis* e *P. unicolor* são conhecidos apenas pelos seus respectivos holótipos. No caso de *P. unicolor*, o holótipo é composto por uma pele montada para exposição e um crânio quebrado. Leite et al. (2007) coletaram o que acreditavam ser um novo exemplar de *P. unicolor*, próximo à localidade tipo da espécie, no entanto Loss & Leite (2011) mostraram que o exemplar coletado pertence, na realidade, à espécie *P. pattoni* e que a sequência de citocromo b (CitB) gerada por Leite et al. (2007),

corresponde a uma cópia paráloga deste marcador, inadequada para análises filogenéticas com objetivos sistemáticos.

Outro exemplo é o caso de *P. nigrispinus*, em que o holótipo é composto apenas de uma pele, sem crânio. A ausência do crânio impossibilita comparações da morfologia interna dessa espécie e, conseqüentemente, dificulta a correta identificação de outros indivíduos. Com isso, Leite (2003), associou incorretamente sequências de DNA de uma espécie aparentemente não descrita a *P. nigrispinus* e sequência de um indivíduo de *P. nigrispinus* a *P. sulinus*. Loss & Leite (2011) esclareceram o equívoco e chamaram atenção para a necessidade de mais estudos que auxiliem na distinção e confirmação da identidade taxonômica de *P. nigrispinus* e *P. sulinus*, uma vez que são espécies irmãs e crípticas, com simpatria em algumas localidades e baixa divergência genética em marcadores moleculares mitocondriais.

Os trabalhos de Emmons et al. (2002) e Leite (2003) representam contribuições muito importantes para o conhecimento do gênero, pois ajudaram a esclarecer a identidade taxonômica não só de *Phyllomys*, mas também de suas espécies. Emmons et al. (2002) designaram lectótipos para cinco espécies e definiram as localidades tipo de todas as espécies conhecidas até então, além de descreverem uma espécie nova (*P. pattoni*). Leite (2003) associou cariótipos disponíveis na literatura às espécies de *Phyllomys*, descreveu duas novas espécies (*P. lundi* e *P. mantiqueirensis*) e sugeriu a existência de outra (*P. aff. dasythrix*), que foi posteriormente descrita como *P. sulinus* (Leite et al., 2008).

A primeira filogenia das espécies de *Phyllomys*, baseada em sequências do gene mitocondrial CitB, incluiu amostras de 9 das 13 descritas na época (Leite, 2003). Apesar da falta de resolução de vários nós da filogenia, principalmente daqueles que representam divergências mais basais, dois clados geograficamente estruturados foram encontrados: clado sul, composto por *P. dasythrix* e *P. sulinus*, com distribuição geográfica do sudeste ao sul do Brasil; e clado nordeste, formado por *P. brasiliensis*, *P. blainvillii* e *P. lamarum*, ocorrendo

no nordeste do Brasil, inclusive nos enclaves de mata da Caatinga. Resultados semelhantes foram encontrados quando mais amostras e mais genes (dois marcadores mitocondriais e dois nucleares) foram utilizados, mas a falta de resolução para as relações mais basais do gênero permaneceram e três linhagens independentes que possivelmente representam espécies não descritas de *Phyllomys* foram identificadas (Loss & Leite, 2011). Além disso, uma nova linhagem representando mais uma possível espécie de *Phyllomys* não descrita foi identificada recentemente (Araújo et al., 2013), ampliando para quatro as potenciais espécies novas para o gênero.

Embora esses estudos representem uma avanço no conhecimento sobre o grupo, muitas questões básicas no que diz respeito a sistemática, taxonomia, limites de distribuição geográfica e relações filogenéticas das espécies de *Phyllomys* ainda estão em aberto. Nesse contexto, os objetivos do presente trabalho foram: (1) construir uma hipótese filogenética mais robusta para diversificação de *Phyllomys* ampliando a matriz de caracteres com mais amostras e marcadores moleculares; (2) datar os eventos de diversificação encontrados; e (3) investigar a identidade taxonômica de *P. sulinus* e *P. nigrispinus*.

2. Material e Métodos

2.1. Espécimes

Amostras de tecido (fígado ou músculo) conservados em etanol foram obtidas de 134 indivíduos e amostras de pele foram retiradas de 9 espécimes, representando no total 9 das 13 espécies descritas de *Phyllomys* (*P. blainvillii*, *P. brasiliensis*, *P. dasythrix*, *P. lamarum*, *P. lundi*, *P. mantiqueirensis*, *P. nigrispinus*, *P. pattoni* e *P. sulinus*) e quatro potenciais espécies não descritas (sp. 1–4) identificadas em Loss & Leite (2011) e Araújo et al. (2013). Como grupos externos

para as reconstruções filogenéticas, foram utilizados representantes dos gêneros filogeneticamente mais próximos de *Phyllomys*, os equimídeos *Echymys chrysurus* e *Makalata didelphoides*. Para as análises de datação molecular foram utilizadas ainda sequências disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) ou geradas no presente trabalho, de representantes de outros 10 gêneros de Echimyidae (*Callistomys*, *Clyomys*, *Echymys*, *Euryzygomatomys*, *Makalata*, *Mesomys*, *Myocastor*, *Thrichomys*, *Trinomys*, *Proechimys*) e de outros Caviomorpha importantes para a calibração do relógio molecular (*Abrocoma*, *Capromys*, *Chinchilla*, *Ctenomys*, *Octodontomys*). Todos os espécimes utilizados no presente trabalho, assim como os respectivos números de acesso do GenBank estão listados no Apêndice 1.

2.2. Obtenção das sequências de DNA

O material genético dos tecidos fixados em etanol foi isolado utilizando o protocolo de extração de DNA total com sal (SDS/NaCl/Proteinase K) descrito por Bruford et al. (1992) e o material retirado das peles foi isolado utilizando-se o kit de extração DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) de acordo com o protocolo descrito por Bi et al. (2013), com pequenas modificações (Apêndice 2). O DNA isolado foi utilizado na reação em cadeia de polimerase (PCR) para amplificação de fragmentos de dois genes mitocondriais, sendo 801 pares de base (pb) do CitB e 657 pb do citocromo c oxidase I (COI) e três genes nucleares, sendo 1.164 pb do exon 28 do fator de von Willebrand (vWF), 681 pb do exon 10 do receptor de hormônio do crescimento (GHR) e 681 pb do gene ativador da recombinase 1 (RAG1), totalizando 3.984 pb por indivíduo. Para o material extraído de pele, apenas os genes mitocondriais foram amplificados. Para cada PCR com volume final de 25 µL foram acrescentados 2,5 µL de tampão 10×, 1,0 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,5 µL de solução de dNTP (10 mM cada nucleotídeo), 0,3 µL de cada primer (10 µM), 3 unidades de Taq Platinum (Invitrogen Corporation) e 1 µL de DNA. Os iniciadores (*primers*) utilizados para a amplificação de cada marcador

estão listados na Apêndice 3. O produto amplificado foi purificado com as enzimas ExoSAP (GE Healthcare Life Sciences) e a reação de sequenciamento foi realizada com kit Big Dye v3.1 (Applied Biosystems) seguindo protocolo do fabricante. Utilizando sequenciador automático ABI 3500, as amostras foram sequenciadas nas duas direções, com os mesmos iniciadores utilizados na PCR, exceto para o coquetel do COI em que foram utilizados os iniciadores M13F (-21) e M13R (-27) para o sequenciamento.

2.3. Alinhamento e cálculo da divergência genética

As sequências geradas foram alinhadas no Geneious 5.6 (Biomatters). Devido à dificuldade de se analisar heterozigotos, foi utilizado nas análises um consenso dos haplótipos de cada indivíduo heterozigoto, com os sítios polimórficos representados segundo o código de ambiguidades (IUPAC, 1974). As divergências genéticas p não corrigida intra e interespecíficas foram calculadas para cada gene no programa MEGA 6 (Tamura et al., 2013).

2.4. Inferências filogenéticas

As filogenias foram inferidas para cada marcador individualmente, assim como para uma matriz combinada com todos os marcadores particionados, permitindo que cada partição assumisse um modelo evolutivo independente. As filogenias construídas com os marcadores mitocondriais CitB e COI foram utilizadas para identificar as amostras ao nível de espécie, uma vez que se mostraram eficientes para esse propósito para vários grupos de espécies distintos (Bradley & Baker, 2001; Hebert et al., 2003; Agrizzi et al., 2012), inclusive para *Phyllomys* (Leite, 2003; Loss & Leite, 2011). Tomando as filogenias dos marcadores mitocondriais como referência, foram escolhidos pelo menos um indivíduo de cada espécie, ou linhagem evolutiva distinta, para compor as análises combinadas com todos os marcadores, totalizando 34 amostras de

Phyllomys e dois grupos externos (*Echimys* e *Makalata*). Para avaliar a diferenciação molecular entre *P. sulinus* e *P. nigrispinus* foram utilizados três conjuntos de dados: as filogenias construídas com os marcadores mitocondriais CitB e COI, individualmente, além de uma filogenia construída com marcadores mitocondriais e o marcador nuclear vWF, particionados (CitB, COI e vWF), utilizando apenas indivíduos previamente associados a essas duas espécies, tendo *P. dasythrix* como grupo externo.

As análises de máxima verossimilhança e o teste de *bootstrap* foram realizadas no programa RaxML (Stamatakis, 2014), na plataforma CIPRES (<https://www.phylo.org/portal2>), empregando o modelo de evolução GTR + G (gama) para todas as partições e para as análises individuais de cada marcador, pois é o único modelo implementado pelo programa. As análises bayesianas foram realizadas no pacote BEAST 2.1.3 (Bouckaert et al., 2014), por 10^7 gerações, amostrando-se uma árvore a cada 10^3 gerações, totalizando 10^4 árvores. O consenso entre as árvores foi gerado no programa TreeAnnotator do pacote BEAST, eliminando-se as primeiras 10^3 árvores. Os arquivos de saída das corridas Bayesianas foram avaliados no Tracer 1.5 (Drummond & Rambaut, 2007) a fim de se averiguar a convergência da cadeia a uma distribuição estacionária. As análises foram rodadas por pelo menos três vezes para se evitar locais sub-ótimos. Os modelos de evolução, para cada partição das análises Bayesianas combinadas e para as análises individuais de cada marcador, foram determinados utilizando-se o Critério de Informação Bayesiano (BIC) implementado no jModelTest 2.1.4, permitindo três esquemas de substituição e estimativa do parâmetro *G* (ver Apêndice 4 para modelos selecionados). O parâmetro *I* (proporção de sítios invariáveis) foi excluído devido à possibilidade de não independência entre *G* e *I* (Mayrose et al., 2005; Stamatakis, 2006). Todos os modelos de evolução foram estimados incluindo-se os grupos externos. Para as análises Bayesianas, foram considerados significativos apenas os grupos com probabilidade posterior bayesiana igual ou maior a 95 % (PPB $\geq 0,95$). Para as

análises de máxima verossimilhança foram discutidos apenas grupos com valores de *bootstrap* igual ou maior que 50 %, sendo considerado elevado suporte estatístico valores maiores ou iguais a 70 %.

2.5. Relógio molecular

A matriz de dados para as análises do relógio molecular foi composta por 50 unidades taxonômicas operacionais (UTO's) (Apêndice 1) e quatro marcadores moleculares (CitB, GHR, RAG1 e vWF), totalizando 3.330 pb por UTO. Os modelos de evolução para cada partição foram determinados no jModelTest 2.1.4 seguindo os mesmos critérios utilizados para as análises Bayesianas (ver Apêndice 4 para modelos selecionados). A datação foi feita no programa BEAST 2.1.3 com modelos de evolução e taxas de relógio independentes entre as partições. Para cada partição foi aplicado um modelo de relógio relaxado com distribuição Lognormal (*relaxed clock Log Normal*). Para a construção da árvore foi aplicado *prior* do modelo de Yule. A monofilia foi forçada para todos os pontos de calibração, assim como para as relações entre as espécies de *Phyllomys*, reconstruída de acordo com a topologia resultante da análise Bayesiana com todos os marcadores moleculares. O relógio foi calibrado utilizando-se três registros fósseis importantes para a reconstrução da evolução dos Caviomorpha na América do Sul, seguindo Upham et al. (2013). Os valores mínimos da datação do fóssil foram utilizados como limites inferiores da estimativa (*offset*), assegurando que as estimativas de datações das linhagens sejam mais antigas que a datação do fóssil correspondente. Para todos os pontos de calibração do relógio foram utilizados *priors* com distribuição Lognormal, média 0 e desvio padrão 1.

O primeiro ponto de calibração utilizado foi o ancestral comum mais recente (ACMR) entre Chinchilloidea e Octodontoidea, representado pelo Octodontoidae mais antigo, *Draconomys verai* (Vucetich et al., 2010; Antoine et al., 2012), da Formação Sarmiento do Oligoceno inferior, em Gran Barranca

(Argentina), estimada entre 29,5 e 31,1 milhões de anos (Ma) atrás. O nó foi calibrado com a idade mínima de 29,5 Ma e intervalo de confiança (IC) de 95 % = 29,5–34,7 Ma. O segundo ponto de calibração foi o ACMR entre Octodontidae e Ctenomyidae, representado por um ramo ancestral ("stem taxa") da linhagem de *Ctenomys*, o *Xenodontomys simpsoni* (Verzi, 2008; Verzi et al., 2013) da Formação Los Salitres do Mioceno tardio, em Laguna Chasicó (Argentina), estimada entre 5,7 e 6,0 Ma (Verzi, 1999, 2008). O nó foi calibrado com a idade mínima de 5,7 Ma (IC 95 % = 5,7–10,9 Ma). O terceiro ponto de calibração foi o ACMR do clado *Thrichomys-Myocastor-Callistomys-Proechimys* (Loss et al., 2014), representado por um ramo ancestral da linhagem de *Thrichomys*, o *Pampamys emmonsae* (Verzi et al., 1995, 2013; Olivares & Verzi, 2014), da Formação Cerro Azul do Mioceno tardio, em Laguna Chillhué (Argentina), estimada entre 6,0 e 9,3 Ma (Verzi et al., 2008). O nó foi calibrado com a idade mínima de 6,0 Ma (IC 95 % = 6,0–11,2 Ma).

3. Resultados

3.1. Divergência genética

Os marcadores mitocondriais CitB e COI apresentaram maior divergência genética média entre sequências de *Phyllomys*, sendo 7,4 % e 7,9 %, respectivamente (Tabela 1). Dentre os marcadores nucleares, vWF foi o que apresentou maior divergência média (1,4 %) entre sequência de *Phyllomys*, seguido por GHR (0,7 %) e RAG1 (0,5 %). Em GHR e RAG1, a distância máxima registrada entre dois haplótipos de *Phyllomys* (1,7 % e 1,3 %, respectivamente), foi maior que a distância média entre *Phyllomys* e o grupo externo *Echimys* (1,6 % para GHR e 0,8 % para RAG1), no entanto menor que entre *Phyllomys* e *Makalata* (2,8 % para GHR e 1,9 % para RAG1). As divergências máximas

registradas dentro de *Phyllomys* para o CitB, COI e vWF foram, respectivamente, 13,0 %, 13,7 % e 4,2 % (Tabela 1).

Tabela 1. Divergência genética p não corrigida média e máxima calculada dentro de *Phyllomys* e média calculada entre *Phyllomys* e os grupos externos *Echimys* e *Makalata*.

marcador	UTO's de <i>Phyllomys</i>	distância genética p não corrigida e erro padrão (%)			
		dentro de <i>Phyllomys</i>		média entre <i>Phyllomys</i> e grupo externo	
		média	máxima	<i>Echimys</i>	<i>Makalata</i>
CitB	141	7,4 ± 0,8	13,0 ± 1,9	14,5 ± 1,5	16,1 ± 1,8
COI	124	7,9 ± 0,7	13,7 ± 1,5	14,7 ± 1,6	14,8 ± 1,3
GHR	42	0,7 ± 0,2	1,7 ± 0,7	1,6 ± 0,6	2,6 ± 0,8
RAG1	41	0,5 ± 0,2	1,3 ± 0,6	0,8 ± 0,3	1,9 ± 0,6
vWF	85	1,4 ± 0,6	4,2 ± 1,8	5,1 ± 1,9	4,3 ± 1,7

3.2. Inferências filogenéticas

De uma maneira geral, os diferentes critérios de otimização recuperaram topologias muito similares, portanto serão mostradas apenas as árvores de inferência bayesiana. Diferentes marcadores indicaram topologias distintas em alguns casos, sugerindo diferentes relações entre as espécies apesar de grande parte ser congruente (ver Apêndice 5 para as filogenias recuperadas e Apêndice 6 para comparação das principais diferenças encontradas). A topologia da análise bayesiana recuperada com todos os marcadores (Figura 1) foi utilizada como referência para comparação com as topologias geradas a partir de outros marcadores (Apêndice 6).

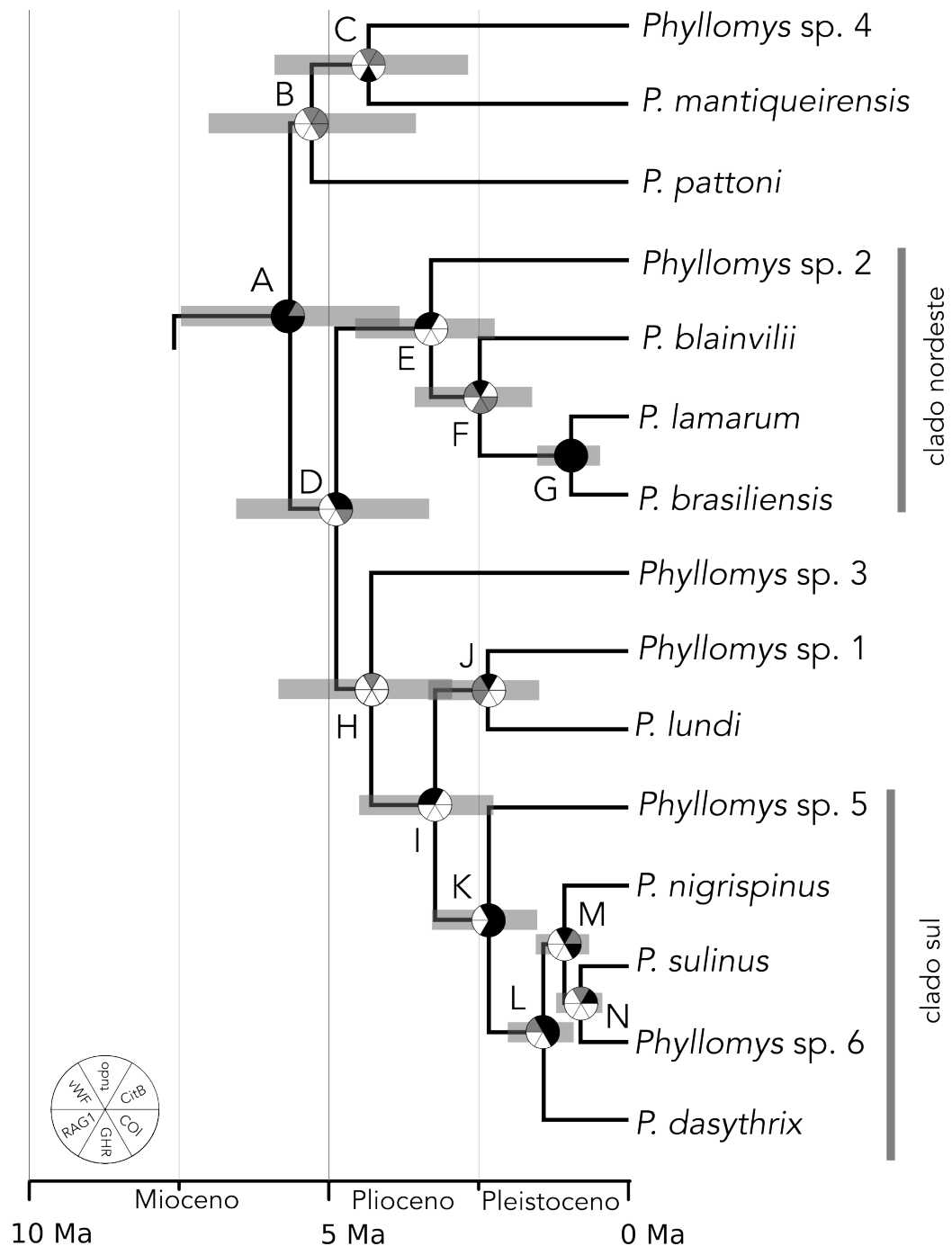


Figura 1. Topologia recuperada nas análises de inferência bayesiana de espécies de *Phyllomys*. Suporte estatístico dos clados com cada marcador molecular (CitB, COI, GHR, RAG1, vWF e todos juntos) estão representados pelos círculos: preto = clado recuperado com probabilidade posterior bayesiana (PPB) ≥ 95 ; cinza = clado recuperado, porém com PPB < 95 ; e branco = clado não recuperado. Eixo horizontal indica tempo em milhões de anos (Ma) e barras cinzas indicam intervalo de confiança de 95 % da estimativa do tempo de divergência para cada nó.

3.2.1. Monofilia do gênero e das espécies

A monofilia do gênero *Phyllomys* (nó A da Figura 1) foi recuperada com suporte estatístico por cinco dos seis conjuntos de dados analisados (COI, GHR, RAG1, vWF e todos os marcadores). Na análise bayesiana com o CitB, a monofilia foi recuperada, porém sem suporte, e na análise de máxima verossimilhança com o mesmo marcador, o grupo externo *Echimys* ficou interno a *Phyllomys*, também sem suporte (filogenia não mostrada, ver Apêndice 6 para nós recuperados e valores de suporte em cada análise). As filogenias construídas com os marcadores mitocondriais CitB, COI assim como àquela com todos os marcadores juntos (Figuras II, III e V do Apêndice 5 e Figura 1) recuperaram 15 linhagens evolutivas distintas que podem ser associadas a espécies de *Phyllomys*, sendo 9 delas já descritas (*P. blainvillii*, *P. brasiliensis*, *P. dasythrix*, *P. lamarum*, *P. lundii*, *P. mantiqueirensis*, *P. nigrispinus*, *P. pattoni* e *P. sulinus*), quatro potenciais espécies não descritas citadas na literatura (Loss & Leite, 2011; Araújo et al., 2013) e duas linhagens inéditas que provavelmente também representam espécies ainda não descritas, identificadas no presente trabalho como *Phyllomys* sp. 5 e sp. 6. A monofilia de todas essas espécies foi robusta com os marcadores CitB e COI individualmente e com todos juntos, apesar de *P. sulinus*, não ter apresentado suporte estatístico nas análises de COI, nem com todos os marcadores (Apêndice 7). No entanto, *P. sulinus* foi recuperado com suporte nas análises de CitB apenas e CitB, COI e vWF combinados (Figura III do Apêndice 5, e Apêndice 7).

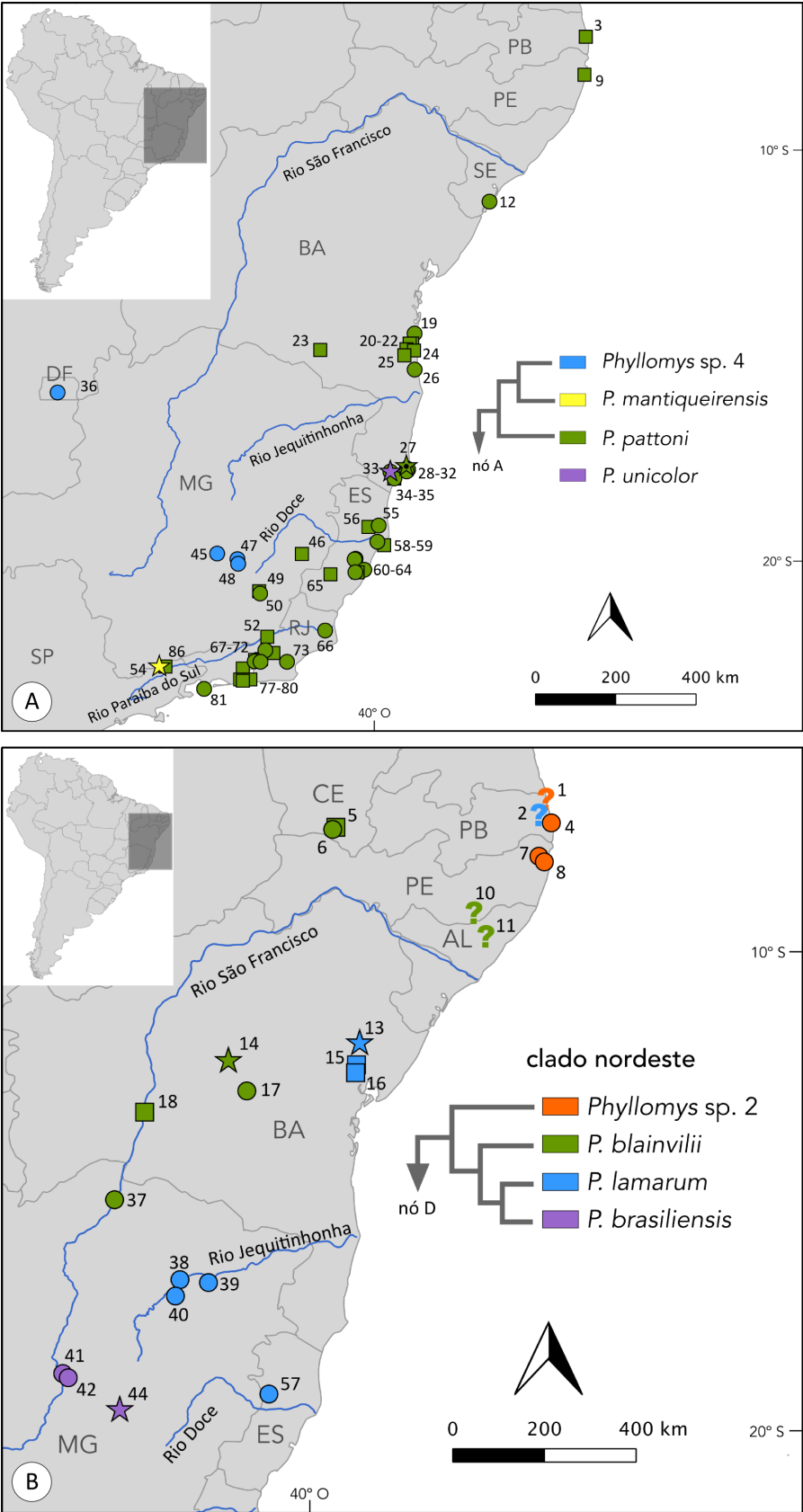
3.2.2. Topologia e distribuição geográfica

A análise bayesiana com todos os marcadores (Figura 1) recuperou 14 clados supraespecíficos (A–N), sendo que apenas três (B, C e H) não apresentaram suporte estatístico nem nas análises bayesianas nem nas de máxima verossimilhança. A partir da base da filogenia, podem ser identificados dois clados, um formado por (*P. pattoni* (*Phyllomys* sp. 4 + *P. mantiqueirensis*)), porém sem suporte estatístico (clado B), com distribuição do nordeste do estado

de São Paulo até o estado da Paraíba (Figura 2A); e outro com todas as outras espécies (clado D). O clado D, por sua vez, apresenta quatro linhagens: 1) clado E formado por (*Phyllomys* sp. 2 (*P. blainvillii* (*P. lamarum* + *P. brasiliensis*))), com distribuição geográfica em enclaves de floresta úmida na Caatinga e Cerrado do nordeste e sudeste do Brasil ao norte do Rio Doce (Figura 2B); 2) *Phyllomys* sp. 3 que ocorre no estado do Rio de Janeiro (Figura 2C); 3) clado J formado por *Phyllomys* sp. 1 e *P. lundii* com distribuição da bacia do Rio Doce no estado de Minas Gerais até o estado do Rio de Janeiro (Figura 2C); 4) clado K formado por (*Phyllomys* sp. 5 (*P. dasythrix* (*P. nigrispinus* (*P. sulinus* + *Phyllomys* sp. 6))))) com distribuição do sul do estado do Rio de Janeiro até o sul do Brasil, no estado do Rio Grande do Sul (Figura 2D).

3.3. Relógio molecular

As análises de datação molecular (Figura 1 e Apêndice 9) indicaram a diversificação entre *Phyllomys* e o grupo irmão amazônico *Echimys*, com base no tempo do ancestral comum mais recente (t_{ACMR}), durante o Mioceno, há cerca de 10 Ma (IC 95 % = 7,63–13,14 Ma) atrás. As diversificações mais antigas das espécies de *Phyllomys* foram estimadas na transição Plioceno/Mioceno há cerca de 5,65 Ma (IC 95 % = 3,97–7,46 Ma). Grande parte das diversificações dentro do gênero ocorreram durante o Plioceno, sendo algumas mais recentes, como das espécies do clado L, estimadas para o Pleistoceno (Figura 1 e Apêndice 9).



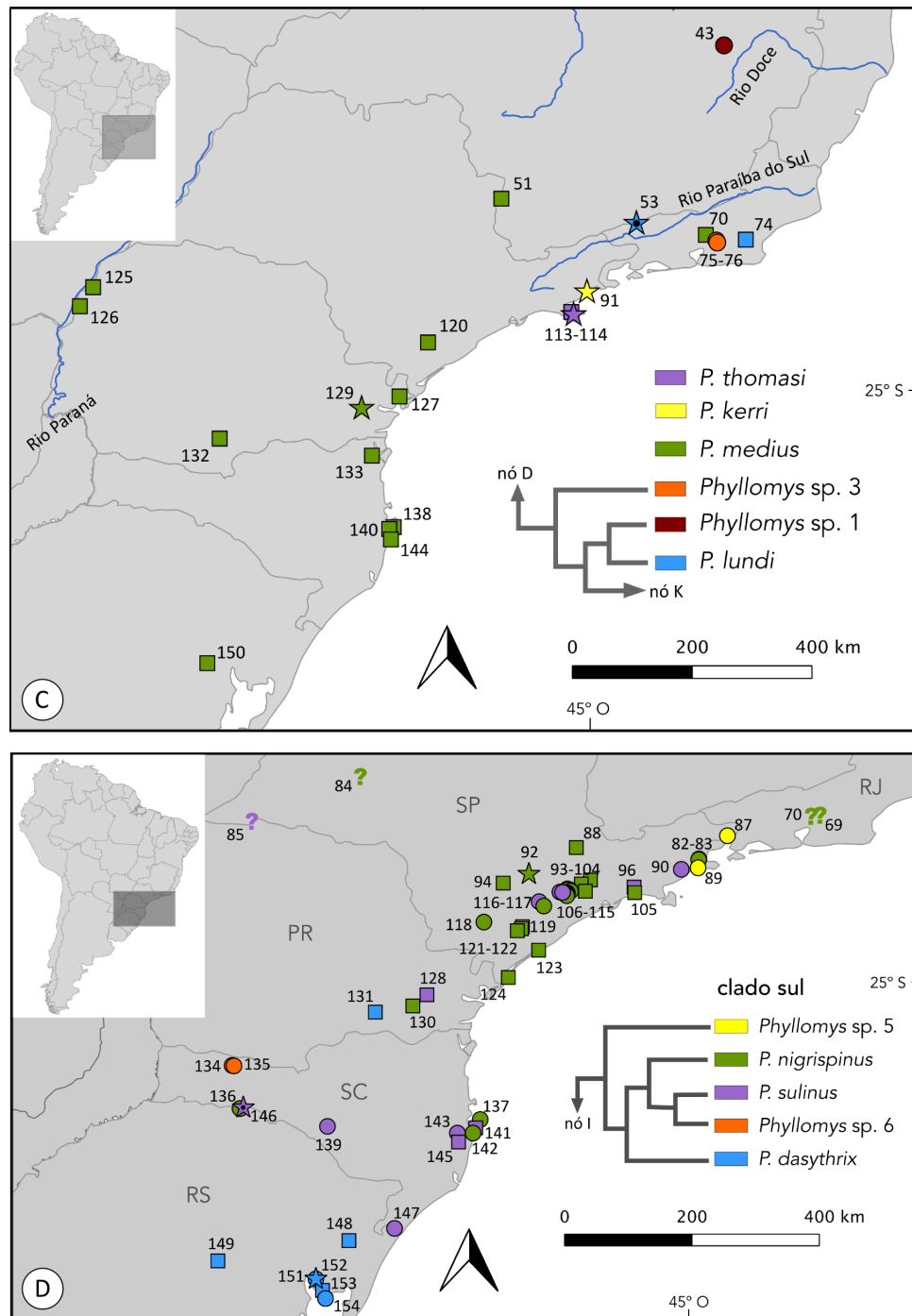


Figura 2. Mapas de distribuição das espécies de *Phyllomys*. Quadrados representam espécimes identificados por dados morfológicos; círculos indicam espécimes com sequências de DNA associada; interrogação significa identificação taxonômica incerta; estrela indica localidade tipo; estrela com um ponto significa que foram obtidas sequências de DNA do holótipo. As localidades estão numeradas de acordo com o Apêndice 8.

4. Discussão

4.1. Sistemática molecular e taxonomia de *Phyllomys*

As análises moleculares sugerem a existência de seis linhagens independentes ainda não associadas a qualquer espécie descrita de *Phyllomys*. *Phyllomys* sp. 1, sp. 2 e sp. 3 foram reportadas por Loss & Leite (2011) e *Phyllomys* sp. 4 por Araújo et al. (2013). Asfora (2011) descreveu a morfologia de *Phyllomys* sp. 2 e Abreu-Júnior (2013) de *Phyllomys* sp. 5. O presente estudo reporta pela primeira vez *Phyllomys* sp. 6.

Quatro espécies descritas de *Phyllomys* não foram incluídas nas análises moleculares por não haver sequência de DNA disponível, são elas: *P. kerri*, *P. medius*, *P. thomasi* e *P. unicolor*. A validade de *Phyllomys* sp. 1, sp. 2, sp. 3 e sp. 4 foi discutida por Asfora (2011), Loss & Leite (2011) e Araújo et al. (2013). Nenhum dos trabalhos citados incluiu uma minuciosa análise morfológica, no entanto, observações preliminares de dados morfológicos, cariotípicos e de distribuição geográfica associadas às evidências filogenéticas sugerem que estas linhagens não pertençam a nenhuma das espécies descritas de *Phyllomys* não representadas na filogenia. Apesar da análise morfológica também não ser o foco principal do presente trabalho, esses dados foram analisados juntamente com dados moleculares e de distribuição geográfica na tentativa de se esclarecer a identidade taxonômica de *Phyllomys* sp. 5 e de *Phyllomys* sp. 6. em relação a *P. sulinus* e *P. nigrispinus*.

4.1.1. *Phyllomys* sp. 5

Foram incluídos três exemplares associados a *Phyllomys* sp. 5 nas análises, todos coletados no sul do estado de São Paulo, na região da Serra do Mar. Dois deles são da Estação Ecológica do Bananal (Abreu-Júnior, 2013) (Figura 2D, localidade 87) e um de Picinguaba (Pinheiro & Geise, 2008) (Figura 2D, localidade 89). O exemplar de Picinguaba (PSP 51) foi previamente identificado como *P.*

pattoni (Pinheiro & Geise, 2008), no entanto, as análises moleculares mostraram que esse espécime pertence a uma linhagem filogeneticamente distinta (Figura 1) e apresenta uma divergência genética de CitB de $10,2 \pm 1,5$ % (Apêndice 10), compatível com altos valores encontrados entre espécies de *Phyllomys* (Loss & Leite, 2011). As análises filogenéticas indicam ainda *Phyllomys* sp. 5 irmão do grupo formado por *P. dasythrix*, *P. nigrispinus*, *P. sulinus* e *Phyllomys* sp. 6 (nó K, Figura 1), com uma divergência genética entre 7,9 % e 8,7 % em relação a essas espécies para o CitB (Apêndice 10) entre essas duas linhagens. Portanto, *Phyllomys* sp. 5 não pertence a nenhuma das espécies descritas amostradas na filogenia molecular.

As espécies não representadas na filogenia, *P. thomasi* e *P. unicolor*, são as que possuem maior tamanho corporal dentro do gênero, sendo consideravelmente maiores que *Phyllomys* sp. 5, que apresenta corpo com tamanho médio, seguindo critérios de Leite (2003). Além disso, *P. thomasi* é endêmico da Ilha de São Sebastião (Figura 2C, localidades 113 e 114) e *P. unicolor* conhecido apenas da localidade tipo em Caravelas, Bahia (Figura 2A, localidade 33). Portanto, a associação de *Phyllomys* sp. 5 a uma dessas duas espécies pode ser descartada por diferenças de tamanho corporal e de distribuição geográfica. No entanto, as localidades de coleta de *Phyllomys* sp. 5 são próximas a ocorrência de *P. kerri* (Ubatuba, São Paulo; Figura 2C, localidade 91) e de *P. medius* (que se estende da região central do estado do Rio de Janeiro até o estado do Rio Grande do Sul; Figura 2C). A pelagem de *Phyllomys* sp. 5 é distinta de *P. medius* que apresenta os aristiformes da corcunda longos e finos, mas semelhante a *P. kerri*, com aristiformes da corcunda de tamanho médio e largos. No entanto, algumas características cranianas diferem entre *P. kerri* e *Phyllomys* sp. 5 como a largura do palato na altura do primeiro molar e a raiz ventral do processo angular da mandíbula.

As alternativas mais possíveis diante das observações apresentadas seriam *Phyllomys* sp. 5 representar uma espécie de *Phyllomys* ainda não descrita ou

pertencer a *P. kerri*. No entanto, como a amostragem de *P. kerri* é restrita a apenas três indivíduos da mesma localidade, pouco se conhece sobre sua variação morfológica intraespecífica, não sendo portanto possível fazer tal associação. A inclusão de sequências de DNA de um dos três indivíduos de *P. kerri* conhecidos seria de extrema importância para resolver essa questão taxonômica.

4.1.2. *Phyllomys nigrispinus*, *P. sulinus* e *Phyllomys* sp. 6

Leite (2003) e Leite et al. (2008) chamaram atenção para as semelhanças morfológicas entre *P. sulinus* e *P. nigrispinus*, no entanto, Leite (2003) havia associado equivocadamente sequências de CitB de *Phyllomys* sp. 3 a *P. nigrispinus*, o que levava a conclusão de que *P. nigrispinus* e *P. sulinus* eram geneticamente distintas e filogeneticamente distantes, apesar de serem morfológicamente semelhantes. Loss & Leite (2011) esclareceram esse equívoco em relação as sequências associadas a *P. nigrispinus* e associaram novas sequências de CitB a essa espécie, sugerindo que *P. sulinus* e *P. nigrispinus* representam duas linhagens evolutivas irmãs que divergiram recentemente, sendo geneticamente muito próximas (cerca de 2,4 % de divergência para o CitB; Apêndice 10).

Loss & Leite (2011) chamaram atenção para a necessidade de se avaliar o *status* taxonômico dessas duas espécies, uma vez que se tratam de táxons muito semelhantes morfológica e geneticamente, podendo ser consideradas espécies crípticas e simpátricas. No presente trabalho, a adição de novas amostras com morfologia semelhante a *P. nigrispinus* e *P. sulinus* provenientes da área de distribuição dessas duas espécies, resultaram em três clados distintos: *P. sulinus*, irmão de *Phyllomys* sp. 6 (com divergência genética do CitB de 1,9 %; Apêndice 17) e esses dois, por sua vez, irmãos de *P. nigrispinus* (divergência genética do CitB cerca de 2,5 %; Apêndice 10).

Os 12 exemplares identificados como *Phyllomys* sp. 6 foram coletados no centro-oeste do estado de Santa Catarina durante um resgate de fauna para a implementação da Pequena Central Hidrelétrica de Ludesha, em duas localidades distintas, porém próximas (cerca de 5 km de distância), sendo dois indivíduos do município de Ipuçu e dez do município de São Domingos (Figura 2D, localidades 134 e 135). Todos esses indivíduos se agruparam em um clado, aqui denominado *Phyllomys* sp. 6. De uma maneira geral, *P. sulinus* e o grupo irmão *Phyllomys* sp. 6 apresentam pelagem e morfologia craniana semelhantes, no entanto o último apresenta uma característica externa marcante que é a presença de uma porção de pelos brancos cobrindo a extremidade distal da cauda (Figura 3). A extensão da cobertura desses pelos brancos pode variar de 10 a 70 % do comprimento da cauda e foi verificada em todos os exemplares de *Phyllomys* sp. 6 com a cauda preservada, coletados na região (n = 12).



Figura 3. Exemplares de *Phyllomys* sp. 6, evidenciando coloração esbranquiçada na porção distal da cauda.

Levando em conta as semelhanças morfológicas e baixa divergência genética encontradas entre as três linhagens (*P. sulinus*, *P. nigrispinus* e

Phyllomys sp. 6), podemos considerar três hipóteses para a classificação desses grupos. Hipótese 1, as três linhagens representam uma espécie; hipótese 2, duas espécies, *P. sulinus* e *P. nigrispinus*, sendo *Phyllomys* sp. 6 uma população de *P. sulinus* e hipótese 3, três espécies distintas.

Para discutir as três hipótese propostas, primeiramente é necessário realizar a difícil tarefa de escolher e aplicar um conceito de espécie. São vários os conceitos de espécie propostos na literatura: biológico, ecológico, filogenético, evolutivo, monofilético, dentre outros (para revisão e discussão dos principais conceitos, ver Mayden, 1997; Wilkins, 2011; Wheeler, 2012). No entanto, nenhum deles é capaz de atender as necessidades de classificação de toda diversidade que conhecemos e continuamos a descobrir. Classificar a diversidade é um processo artificial e por isso complicado. A razão para classificação advém da nossa necessidade de nomear grupos que consideramos dignos de estudos, discussão e registro de dados. Tal necessidade não necessariamente está ligada ao processo de especiação *per se* e portanto, em alguns casos (talvez a maioria deles) as espécies não sejam entidades facilmente identificáveis na natureza, o que complica ainda mais a tarefa de nomeá-las. No entanto, a dificuldade em classificá-las não deve ser um impedimento à tentativa de fazê-lo.

No presente trabalho, as hipóteses propostas serão discutidas utilizando-se o conceito filogenético de espécie proposto por Cracraft (1983), onde espécies são agrupamentos diagnosticáveis irreduzíveis de organismos que se distinguem de outros agrupamentos com essas características e apresentam um padrão parental de ancestralidade e descendência. Os caracteres diagnósticos podem ser representados por qualquer atributo intrínseco do organismo, como genéticos, morfológicos ou comportamentais. Cracraft (1983, 1989) propõe ainda que espécies são táxons evolutivamente diferentes e que o isolamento reprodutivo é importante, porém não uma consequência obrigatória produzida pelo processo de diferenciação. No entanto, o isolamento reprodutivo de indivíduos de uma mesma população é geralmente crítico para delimitar espécies

corretamente (Cracraft, 1983, 1989). O uso de ferramentas moleculares permite avaliar com mais precisão a ancestralidade e descendência dos organismos por meio das observações do ancestral comum mais recente e também do isolamento reprodutivo por evidências de monofilia. No entanto, a maior subjetividade da aplicação do conceito filogenético, neste caso, fica por conta da definição dos “agrupamentos diagnosticáveis irreduzíveis”, especialmente quando se está discutindo a validade de grupos irmãos como espécies distintas.

Levando em conta o conceito de espécie acima exposto, as três hipóteses para a classificação das linhagens identificadas como *P. sulinus*, *P. nigrispinus* e *Phyllomys* sp. 6 podem ser discutidas. Na hipótese 1, as três linhagens representam uma única espécie. Observando-se a distribuição geográfica dos indivíduos amostrados na filogenia (Figura 2D), percebe-se uma sobreposição entre as áreas de ocorrência dessas linhagens, inclusive com sintopia de *P. sulinus* e *P. nigrispinus* em pelo menos três localidades (82, 109 e 136) ao longo da distribuição geográfica desses grupos. Como essas duas linhagens são representadas por clados distintos e, portanto, evolutivamente independentes, há evidências de isolamento reprodutivo de indivíduos de uma mesma população e a hipótese de uma espécie não se aplica neste caso.

Na hipótese 2, as três linhagens representam duas espécies: *P. nigrispinus* e *P. sulinus*, sendo *Phyllomys* sp. 6 uma população desta última. *Phyllomys* sp. 6 é restrito a uma área geográfica muito pequena e é a única linhagem registrada neste local, apesar de próxima de uma localidade onde há registro de *P. sulinus* e *P. nigrispinus* (cerca de 80 km em linha reta; Figura 2D, localidades 135 e 136), portanto essas linhagens não são sintópicas na localidade de ocorrência de *Phyllomys* sp. 6, não sendo possível verificar o isolamento reprodutivo de indivíduos de uma mesma população como indicativo para delimitar espécie. Essa distribuição sugere sim que os indivíduos de *P. sulinus* distribuídos mais ao sul compartilham ancestral comum mais recente com *P. sulinus* de regiões mais distantes (ao norte da distribuição) do que com os *Phyllomys* sp. 6 que estão

geograficamente mais próximos, o que sugere um isolamento reprodutivo entre indivíduos geograficamente muito próximos. O aparente isolamento reprodutivo entre *Phyllomys* sp. 6 e *P. sulinus*, associado ao fato de *Phyllomys* sp. 6 ser diagnosticável por características da pelagem da cauda, nos permite descartar a hipótese 2 e aceitar a hipótese 3.

Na hipótese 3, cada linhagem representa uma espécie distinta. As maiores objeções quanto a essa hipótese são a baixa divergência genética (entre 1,9 % e 2,5 %, ver Apêndice 10) associada à grande similaridade observada entre as linhagens, principalmente da morfologia craniana. No entanto, características da pelagem são importantes na diagnose de espécies de *Phyllomys* e outros Echimyidae com morfologia craniana quase indistinguíveis (Emmons et al., 2002; Leite, 2003; lack-Ximenes et al., 2005; Patterson & Velazco, 2008). Além disso, a dificuldade de se identificar caracteres diagnósticos dentro da família também ocorre entre espécies de uma mesmo gênero que apresentam divergência genética relativamente elevada (como *P. nigrispinus* e *Phyllomys* sp. 3, ou *Trinomys paratus* e *T. iheringi*, por exemplo), indicando que nem sempre a morfologia reflete o processo evolutivo que levou a diversificação das linhagens de Echimyidae, principalmente no nível específico. A distribuição restrita de *Phyllomys* sp. 6 não deve ser um impedimento ao reconhecimento desta população como uma espécie. Cracraft (1989) sugeriu que populações diagnosticáveis podem ser bem pequenas e que isso não é um artefato arbitrário do conceito filogenético de espécies, mas simplesmente um reflexo do processo natural de diferenciação taxonômica em que populações de todos os tamanhos podem se tornar isoladas e então se diferenciarem. Levando em conta a relação de ancestralidade e descendência dentre os membros de cada linhagem em questão, aliado ao isolamento reprodutivo inferido por meio da filogenia e a possibilidade de se diagnosticar a nova linhagem representada por *Phyllomys* sp. 6, considero que esses três clados representam três espécies distintas. A identificação de novos indivíduos associados tanto a *P. sulinus* quanto a *P.*

nigrispinus incita ainda uma revisão dos caracteres diagnósticos dessas duas espécies.

A presença de pelos brancos na porção final da cauda é uma característica pouco comum, porém presente em algumas espécies de roedores, inclusive vários Echimyidae. Além de *Phyllomys* sp. 6, os três exemplares de *Phyllomys* sp. 1 conhecidos apresentam uma pequena porção da cauda com pelos brancos. Outros roedores da família Echimyidae, como *Echymys chrysurus*, *Echymys vierai*, *Santamartamys rufordorsalis*, *Ollalamys albicauda* e *Callistomys pictus* são também caracterizados por apresentarem cerca de metade da cauda coberta por pelos brancos. Apenas o intercruzamento entre indivíduos de uma mesma população pode não ser suficiente para explicar a fixação de uma característica com baixa frequência que não seja adaptativa, como parece ser o caso da cauda branca. No entanto, quando a população é fundada por um pequeno número de indivíduos, características podem ser fixadas por deriva genética. *Phyllomys* sp. 6 parece ser restrito a uma pequena área de ocorrência, no limite sudoeste da distribuição do grupo irmão, *P. sulinus*, e pode ter se diversificado por uma processo de isolamento periférico. Uma pequena população ancestral de *P. sulinus* pode ter ficado isolada durante o Pleistoceno (0,43 a 1,22 Ma; Figura 1 e Apêndice 9) e fundado a linhagem de *Phyllomys* sp. 6.

4.1.3. Distribuição geográfica das linhagens

Os estudos anteriores abordando filogenia das espécies de *Phyllomys* (Leite, 2003; Loss & Leite, 2011) sugerem a existência de dois grupos de espécies restritos geograficamente, o clado sul, formado por *P. sulinus*, *P. nigrispinus* e *P. dasythrix*, com distribuição ao sul do Rio Paraíba do Sul no estado do Rio de Janeiro até o norte do estado do Rio Grande do Sul e o clado nordeste, formado por *P. blainvillii*, *P. lamarum* e *P. brasiliensis*, com distribuição ao norte do Rio Doce no estado do Espírito Santo, até o sul do estado do Ceará, ocupando inclusive os enclaves de floresta úmida na Caatinga. Levando em conta a

filogenia e distribuição geográfica das linhagens apresentadas no presente trabalho, o clado sul deve incluir também *Phyllomys* sp. 5, (correspondendo ao nó K na Figura 1) e o clado nordeste deve incluir *Phyllomys* sp. 2 (correspondendo ao nó E na Figura 1).

Phyllomys sp. 1, sp. 3 e *P. lundi* são representadas por no máximo três indivíduos cada, conhecidas de poucas localidades e distribuídas entre os estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro (Figura 2C). São linhagens filogeneticamente mais próximas do clado sul, mas sem suporte estatístico para a posição de *Phyllomys* sp. 3.

Irmãos de todas as demais espécies de *Phyllomys*, estão *P. pattoni*, *P. mantiqueirensis* e *Phyllomys* sp. 4. *Phyllomys pattoni* é a espécie do gênero com distribuição geográfica mais ampla, ocupando principalmente regiões próximas ao litoral, inclusive áreas de manguezais, do estado do Rio de Janeiro ao estado de Paraíba (Figura 2A). *Phyllomys mantiqueirensis* é conhecido apenas por um indivíduo coletado no alto da Serra da Mantiqueira no estado de Minas Gerais, a 1.850 m de altitude (Figura 2A, localidade 54). *Phyllomys* sp. 4 havia sido registrada por Araújo et al. (2013) em áreas de Mata Atlântica no centro-leste do estado de Minas Gerais (Figura 2A, localidades 45, 47 e 48). No presente trabalho registramos um indivíduo coletado no Distrito Federal (Fig. 2A, localidade 36), a pelo menos 600 km de distância do primeiro registro (Machado et al., em prep.). Essa ocorrência de *Phyllomys* no centro do Cerrado é inesperada, pois o gênero é tido como endêmico da Mata Atlântica.

Os novos exemplares de *P. nigrispinus* e *P. sulinus*, além de *Phyllomys* sp. 6 identificados no presente trabalho, reforçam as incertezas sobre a identificação de alguns indivíduos do clado sul, principalmente do oeste do estado de São Paulo e Minas Gerais (Figura 2D, localidades 84 e 85), como já havia sido sugerido por Olmos (1997) e Leite (2003). Os registros de *P. nigrispinus* em Teresópolis, estado do Rio de Janeiro (Figura 2D, localidades 69 e 70) também são duvidosos e podem representar, por exemplo, exemplares de *Phyllomys* sp.

3, que estão geograficamente próximos destes registros, apesar de estarem em altitudes bastante distintas (*Phyllomys* sp. 3 em Cachoeiras de Macau em altitude ~ 50 m e *P. nigrispinus* em Teresópolis em altitude ~ 900 m). O presente trabalho registra pela primeira vez a ocorrência de *P. nigrispinus* no estado de Santa Catarina, inclusive na ilha de Florianópolis, onde já foram registradas duas outras espécies de *Phyllomys*: *P. medius* e *P. sulinus* (Leite, 2003; Cherem et al., 2004).

Loss & Leite (2011) chamaram atenção para possíveis erros de identificação de *P. blainvillii* na região de ocorrência de *Phyllomys* sp. 2. Consideramos também que os registros de *P. lamarum* no litoral da Paraíba devam ser reavaliados (Figura 2B, localidade 2), uma vez que essas três espécies são morfologicamente similares e o próximo registro mais ao sul para *P. lamarum* fica a cerca de 700 km de distância, em Lamarão, Bahia, localidade tipo da espécie.

4.2. Biogeografia de *Phyllomys* e tempo de divergência

A busca por padrões de diversificação em diferentes organismos que ocupam uma mesma região é importante para auxiliar na investigação sobre eventos que podem ter afetado historicamente a diversificação das espécies locais. Na Mata Atlântica, foram identificadas regiões onde são observados padrões tanto de distribuição da diversidade (Costa et al., 2000; Oliveira-Filho & Fontes, 2000; Silva et al., 2012), quanto na ocorrência de descontinuidades filogeográficas em diferentes grupos estudados (para revisão dos principais trabalhos ver Lara et al., 2005; Batalha-Filho & Miyaki, 2011; Costa & Leite, 2012; Silva et al., 2012). Essas descontinuidades são coincidentes com regiões onde correm importantes rios do leste do Brasil, podendo ser observadas principalmente nas regiões do Rio São Francisco (e.g., Pellegrino et al., 2005; Cabanne et al., 2008), Rio Doce (e.g., Costa, 2003; Carnaval et al., 2009) e Rio Paraíba do Sul (e.g., Graziotin et al., 2006; Martins et al., 2007). No entanto, as datações dessas quebras são em geral mais antigas que a estimativa para o curso

e desembocadura atual desses rios, que datam do Holoceno (Dominguez et al., 1981; Martin et al., 1993), não sendo possível atribuir aos rios atividade vicariante nestes processos de diversificação. As divergências entre os clados E (clado nordeste) e H de *Phyllomys* foram estimadas entre o final do Mioceno e meio do Plioceno de 3,4 a 6,5 Ma atrás (nó D) e apesar de estarem em margens opostas do Rio Doce, os clados parecem ter se diversificado muito antes da formação do rio o que sugere que os dois eventos não estão relacionados. A mesma discordância entre tempo de diversificação e formação do rio pode ser observada para o clado K (clado sul), que se distribui abaixo do rio Paraíba do Sul e tem estimativa de diversificação entre 1,5 e 3,3 Ma atrás.

Outra hipótese para explicar a riqueza da diversidade na Mata Atlântica são os refúgios. Originalmente proposta para a Amazônia (Haffer, 1969), esta hipótese foi extrapolada para a Mata Atlântica (Jackson, 1978; Kinzey, 1982) e sugere que mudanças climáticas no Quaternário durante períodos glaciais mais secos, levaram a formação de fragmentos de floresta isolados e cercados por regiões áridas. Esse isolamento teria levado à especiação alopátrica das espécies refugiadas. Os períodos interglaciais, mais úmidos, favoreceriam a expansão das áreas florestadas que voltariam a se conectar. No entanto, vários estudos paleoclimáticos foram de encontro a essa proposta (Cruz-Jr et al., 2006, 2007; Saia et al., 2008; Pessenda et al., 2009), sugerindo que a floresta mudou de composição, mas persistiu, mesmo durante períodos mais secos. Recentemente, a hipótese dos refúgios ganhou força com a proposta de Carnaval & Moritz (2008) que, usando modelagem da adequabilidade ambiental para Mata Atlântica no passado e presente, sugeriram que este bioma teve uma grande área de estabilidade histórica ao norte do Rio Doce, formando um grande refúgio, enquanto que áreas ao sul teriam sido mais instáveis. De acordo com essa hipótese, espera-se encontrar maior diversidade genética em regiões de refúgio (ao norte do Rio Doce) do que em áreas mais instáveis (sul do Rio Doce).

Por ser um gênero com hábito arborícola, espera-se que a história evolutiva de *Phyllomys* esteja intimamente relacionada com a distribuição passada das áreas florestadas, sendo portanto, um bom modelo para testar a hipótese de refúgios. Dos nove eventos de cladogênese observados em *Phyllomys*, com ocorrência estimada para o Pleistoceno (Figura 1 e Apêndice 9), apenas três deles levaram a linhagens com distribuição atual ao norte do Rio Doce, enquanto seis linhagens estão distribuídas ao sul do rio. Mesmo considerando os eventos apenas com estimativa de intervalo de confiança da ocorrência inteiramente no Pleistoceno, é registrado um evento para linhagens ao norte e três para linhagens ao sul do Rio Doce. Os resultados encontrados para *Phyllomys* estão em desacordo com o esperado segundo a proposta de Carnaval & Moritz (2008) não sendo possível, portanto, atribuir a diversificação dessas linhagens à hipótese de refúgios.

A quebra filogeográfica entre os clados norte e sul de *Phyllomys* ocorre aproximadamente na altura do paralelo 19° S, sendo 10 das 19 espécies encontradas entre os paralelos 22° e 24° S. Essa distribuição sugere que a região entre os rios Doce e Paraíba do Sul deve ter tido um papel importante na origem e distribuição da diversidade do grupo, no entanto, nem a hipótese de rios como barreiras nem a de refúgios é adequada para explicar os resultados encontrados. Apesar do padrão recorrente de distribuição de táxons na Mata Atlântica entre uma porção mais ao norte e outra mais ao sul, ainda não se sabe qual mecanismo foi responsável por moldar essa distribuição (Costa & Leite, 2012; Carnaval et al., 2014).

Alguns autores, no entanto, atribuem os padrões encontrados às diferenças altitudinais e da topografia observadas nesta porção leste do Brasil (Oliveira-Filho & Fontes, 2000; Leite, 2003; Loss & Leite, 2011; Silva et al., 2012), representada pelo Planalto Atlântico (Vervloet & Ross, 2012). O Planalto Atlântico pode ser definido como as regiões serranas que ocorrem ao longo da fachada atlântica, desde o estado do Paraná até o norte do Espírito Santo. Alguns setores

recebem diferentes nomes dependendo da região em que se encontram, sendo Serra do Mar, quando próximo ao litoral, Serra da Mantiqueira quanto mais a oeste, ou ainda Serra dos Órgãos, que corresponde à Serra do Mar no estado do Rio de Janeiro (Vervloet & Ross, 2012). Endler (1977) sugeriu que gradientes ecológicos podem levar a diversificação por especiação parapátrica ao longo de clinas. A altitude na porção sul da Mata Atlântica, devido à presença das cadeias de montanhas, varia desde o nível do mar até cerca de 2.800 m, como no Caparaó (entre os estados de Minas Gerais e Espírito Santo) e no Itatiaia (estado do Rio de Janeiro). Essas diferenças altitudinais imprimem um gradiente ecológico que pode influenciar a diversificação da biota na região. Na Mata Atlântica, estudos apontam variação da composição da fauna de pequenos mamíferos ao longo de gradientes altitudinais, sugerindo que esses gradientes influenciam tanto na distribuição (Bonvicino et al., 1997; Geise et al., 2004) quanto na diversificação (Gonçalves & de Oliveira, 2014) dos grupos.

Gradientes altitudinais podem também ter influenciado a diversificação e distribuição de espécies de *Phyllomys*, como *P. mantiqueirensis*, que ocupada a maior altitude já registrada para o gênero (1.800 m) e parece estar restrito à essa região na Serra da Mantiqueira. Já outras linhagens, como *P. kerri*, *Phyllomys* sp. 3 e *Phyllomys* sp. 5 parecem estar restritas a regiões de baixada, ao sopé da Serra do Mar. As espécies irmãs *P. lamarum* e *P. brasiliensis* estão separadas pela Serra do Espinhaço, ocupando flancos opostos desta cadeia de montanhas, que atua como grande divisor hidrográfico interposto entre as bacias do centro-leste brasileiro e a do rio São Francisco (Saadi, 1995). O início da formação do Planalto Atlântico remonta a eventos tectônicos muito antigos, desde o Proterozóico, devido aos sucessivos movimentos de convergência e divergência de placas durante a formação e dispersão dos supercontinentes (Almeida & Carneiro, 1998). Os repetidos movimentos de convergência e divergência formaram faixas de falhas mais suscetíveis ao movimento, reativadas sucessivas vezes. Apesar da aparente estabilidade da borda leste da placa sul americana, vários estudos

apontam que essas falhas antigas passaram por inúmeros eventos de reativação desde o final do Terciário até o Quaternário, caracterizando a fase de neotectônica da plataforma brasileira, que teve papel decisivo na formação da topografia contemporânea (Saadi, 1993).

Outro importante aspecto da dinâmica da distribuição histórica da Mata Atlântica é sua conexão passada com a Amazônia e enclaves de matas encontrados nos biomas mais áridos que separam as duas regiões florestadas, a Caatinga e o Cerrado. *Phyllomys* é filogeneticamente próximo de outros gêneros com distribuição na Amazônia e Andes (Fabre et al., 2013; Upham et al., 2013; Capítulo 1) e a reconstrução de área ancestral feita por Upham et al. (2013) indica que o ACMR de *Phyllomys* com o grupo irmão *Echimy*s ocupava regiões da Amazônia. As análises de datação molecular estimam que a divergência entre os dois gêneros ocorreu entre 7,5 e 13 Ma atrás e que a diversificação das espécies viventes de *Phyllomys*, possivelmente já na Mata Atlântica, ocorreu entre o Plió-Mioceno estimada entre cerca de 4 e 7,5 Ma atrás. No entanto, a presença de *Phyllomys* sp. 4 em área de Cerrado (estimada entre aproximadamente 430 mil e 1,7 Ma atrás) e de *P. blainvillii* nos enclaves de mata da Caatinga (estimativa entre aproximadamente 1,6 e 3,5 Ma atrás) sugerem uma conexão recente entre Mata Atlântica e Amazônia e expansão das áreas florestadas, reforçando ainda a ideia de que diferentes rotas de conexão podem ter sido utilizadas no passado para dispersão de espécies entre as duas regiões (Costa, 2003; Silva et al., 2012).

4.3. Irradiação não adaptativa

Devido à recorrente falta de resolução da base da filogenia e de relações entre várias linhagens de *Phyllomys* publicada em trabalhos anteriores, mesmo com a utilização tanto de marcadores nucleares quanto mitocondriais, Leite (2003) e Loss & Leite (2011) sugeriram que o processo de diversificação das espécies do gênero pode ter sido rápido e, por esse motivo, difícil de ser reconstruído nas análises filogenéticas. No presente trabalho, mesmo

adicionando mais marcadores moleculares, as relações na base da filogenia não foram recuperadas com suporte estatístico. De fato, as estimativas de tempo de divergência sugerem que houve intervalos de tempo curtos, nos quais várias linhagens podem ter se diversificado quase que simultaneamente (e.g., interseção de estimativa de diversificação para os nós A, B, C e D entre 4 e 6 Ma atrás; Figura 1 e Apêndice 9). Outro aspecto interessante de se observar é a grande discordância encontrada entre as topologias dos diferentes marcadores moleculares, recuperando inclusive com suporte, relações diferentes de outros marcadores. Tal discordância pode ser explicada por retenção de polimorfismo ancestral que também é um indicativo de eventos de irradiação (e.g., Seehausen, 2004).

Existe uma vasta literatura disponível sobre os processos de diversificação rápida, ou irradiação, mas todas quase que exclusivamente associando os eventos de especiação à adaptação, conhecidos como irradiação adaptativa. Entre os exemplos mais populares, podemos destacar a explosão do Cambriano e os Tentilhões das Ilhas Galápagos (para revisão dos processos de irradiação adaptativa ver Glor, 2010; Yoder et al., 2010). Nestes casos, os eventos de diversificação são decorrentes de ocupações de novos nichos por dispersão para novos ambientes, associados à seleção de características que conferem uma maior adequação ao novo ambiente, levando ao processo de adaptação e consequentemente, a especiação. No caso de *Phyllomys*, não há nenhuma diferença clara de nicho ecológico entre as espécies, que são todas morfologicamente muito semelhantes, ocupam habitats florestados, apresentam hábitos arborícolas e noturnos e podem ser encontradas em simpatria em várias regiões. Portanto, não há indicativos de que os eventos de diversificação rápida dentro do gênero foram dirigidos por processos de adaptação a novos ambientes.

Gittenberger (1991) chama atenção para a falta de estudos a respeito de irradiação não adaptativa. O autor ressalta ainda a dificuldade de estudar o

assunto argumentando que negar a existência da irradiação não adaptativa é fácil, se todos os estudos sem evidências de adaptação são considerados com dados insuficientes. Pouco se sabe sobre os mecanismos que podem levar a esse tipo de diversificação, algumas hipóteses sugerem que quando em alopatria ou parapatría, as causas podem ser deriva genética associada a baixa viabilidade dos híbridos, mas em simpatria a exclusão competitiva entre indivíduos ecologicamente similares (um pressuposto plausível, uma vez que não há evidências de adaptação) pode levar à diversificação (Kozak et al., 2006; Rundell & Price, 2009; Wilke et al., 2010).

Em *Phyllomys*, as poucas informações disponíveis sugerem que a prole é geralmente pequena, variando de um a dois filhotes. Uma redução da fertilidade entre híbridos, poderia resultar na verdade, em nenhuma prole, uma vez que o tamanho natural da prole já é bem reduzido. Podemos considerar ainda que os raros registros de *Phyllomys* em listas de inventários sejam um reflexo de um tamanho populacional pequeno. Populações pequenas estão mais sujeitas a ação da deriva genética. Neste caso, *Phyllomys* pode ser um forte candidato a diversificação não adaptativa, por infertilidade dos híbridos associada à ação da deriva genética. Essa hipótese é apenas especulativa, mas pode incitar estudos futuros de hibridização e ecologia dentro do grupo além de busca pelo mesmo padrão em outros grupos.

5. Conclusões

A diversificação e distribuição do gênero *Phyllomys* foi influenciada pela ação conjunta de vários fatores como atividade neotectônica, gradientes ambientais e mudanças climáticas que atuaram desde o Mioceno moldando o relevo e distribuição da diversidade na região da Mata Atlântica, marcando os primeiros eventos de diversificação do gênero até as especiações recentes, no

Pleistoceno. A distribuição das espécies de *Phyllomys*, associada aos resultados da filogenia, sugerem o seguinte cenário evolutivo: um primeiro evento de diversificação partindo do ancestral Amazônico seguindo rotas de conexão pela região do Brasil central, dando origem às linhagens ancestrais de *Phyllomys* sp. 4, *P. pattoni* e *P. mantiqueirensis*, sendo que este último pode ter sido também influenciado por um gradiente altitudinal. A partir da porção central da Mata Atlântica as linhagens nordeste e sul podem ter se diversificado, quase que simultaneamente, ao longo de gradientes latitudinais. As diversificações simultâneas podem ser devido a eventos não adaptativos dirigidos principalmente por deriva genética.

A identificação de duas possíveis espécies novas no presente estudo, eleva o potencial número de espécies de *Phyllomys* de 17 para 19. No início da última década eram reconhecidas apenas 9 espécies para o gênero e a incorporação de dados moleculares tem sido de extrema importância para revelar a diversidade do grupo, camuflada pelas semelhanças morfológicas entre as espécies associada a grande variação morfológica intraespecífica.

6. Referências

- Abreu-Júnior E.F. (2013) *Pequenos mamíferos não voadores da Estação Ecológica de Bananal, SP*. Dissertação de mestrado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", São Paulo.
- Agrizzi J., Loss A.C., Farro A.P.C., Duda R., Costa L.P., & Leite Y.L.R. (2012) Molecular diagnosis of Atlantic Forest mammals using mitochondrial DNA sequences: didelphid marsupials. *The Open Zoology Journal*, **5**, 2–9.
- Almeida F.F.M. & Carneiro C. dal R. (1998) Origem e evolução da Serra do Mar. *Revista Brasileira de Geociências*, **28**, 135–150.
- Antoine P.-O., Marivaux L., Croft D. a, Billet G., Ganerød M., Jaramillo C., Martin T., Orliac M.J., Tejada J., Altamirano A.J., Duranthon F., Fanjat G., Rousse S., & Gismondi R.S. (2012) Middle Eocene rodents from Peruvian Amazonia reveal the pattern and timing of caviomorph origins and biogeography. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences*, **279**, 1319–1326.
- Araújo N.P., Loss A.C., Cordeiro-Junior D.A., Silva K.R., Leite Y.L.R., & Svartman M. (2013) New karyotypes of Atlantic tree rats, genus *Phyllomys* (Rodentia:Echimyidae). *Genome*, **56**, 1–8.
- Asfora P.H. (2011) *Diversidade, diversificação e biogeografia de pequenos mamíferos não-voadores na Mata Atlântica ao norte do Rio São Francisco - Centro de Endemismo de Pernambuco*. Tese de doutorado, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Batalha-Filho H. & Miyaki C.Y. (2011) Filogeografia da Mata Atlântica. *Revista da Biologia*, **Especial B**, 31–34.
- Bi K., Linderorth T., Vanderpool D., Good J.M., Nielsen R., & Moritz C. (2013) Unlocking the vault: next-generation museum population genomics. *Molecular Ecology*, **22**, 6018–6032.
- Bonvicino C.R., Langguth A., Lindbergh S.M., & de Paula A.C. (1997) An elevation gradient study of small mammals at Caparaó National Park, south eastern Brazil. *Mammalia*, **61**, 547–560.
- Bouckaert R., Heled J., Kühnert D., Vaughan T., Wu C.-H., Xie D., Suchard M.A., Rambaut A., & Drummond A.J. (2014) BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Computational Biology*, **10**, e1003537.

- Bradley R.D. & Baker R.J. (2001) A test of the genetic species concept: cytochrome-b sequences and mammals. *Journal of Mammalogy*, **82**, 960–973.
- Bruford M.W., Hanotte O., Brookfield J.F.Y., & Burke T. (1992) Single-locus and DNA fingerprinting. *Molecular Genetic Analyses of Populations: a Practical Approach* (ed. by A.R. Hoelzel), pp. 225–269. IRL Press, Oxford.
- Cabanne G.S., D’Horta F.M., Sari E.H.R., Santos F.R., & Miyaki C.Y. (2008) Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): biogeography and systematics implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **49**, 760–773.
- Cabrera A. (1961) Catálogo de los mamíferos de América del Sur. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia,”* **4**, 309–732.
- Carnaval A.C., Hickerson M.J., Haddad C.F.B., Rodrigues M.T., & Moritz C. (2009) Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. *Science*, **323**, 785–789.
- Carnaval A.C. & Moritz C. (2008) Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography*, **35**, 1187–1201.
- Carnaval A.C., Waltari E., Rodrigues M.T., Rosauer D., VanDerWal J., Damasceno R., Prates I., Strangas M., Spanos Z., Rivera D., Pie M.R., Firkowski C.R., Bornschein M.R., Ribeiro L.F., & Moritz C. (2014) Prediction of phylogeographic endemism in an environmentally complex biome Prediction of phylogeographic endemism in an environmentally complex biome. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences*, **281**, 1471–2954.
- Cherem J.J., Simões-Lopes P.C., Althoff S., & Graipel M.E. (2004) Lista dos mamíferos do estado de Santa Catarina, sul do Brasil. *Mastozoología Neotropical*, **11**, 151–184.
- Costa L.P. (2003) The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *Journal of Biogeography*, **30**, 71–86.
- Costa L.P. & Leite Y.L.R. (2012) Historical fragmentation shaping vertebrate diversification in the Atlantic Forest biodiversity hotspot. *Bones, Clones and Biomes* (ed. by B.D. Patterson and L.P. Costa), pp. 283–306. University of Chicago Press, Chicago.

- Costa L.P., Leite Y.L.R., Fonseca G.A.B., & Fonseca M.T. (2000) Biogeography of South American Forest Mammals: endemism and diversity in the Atlantic Forest. *Biotropica*, **32**, 872–881.
- Cracraft J. (1983) Species concepts and speciation analysis. *Current Ornithology*, **1**, 159–187.
- Cracraft J. (1989) Speciation and its ontology: the empirical consequences of alternative species concepts for understanding patterns and process of differentiation. *Speciation and Its Consequences* (ed. by D. Otto and J.A. Endler), Sinauer Associates, Massachusetts.
- Cruz-Jr F.W., Burns S.J., Jercinovic M., Karmann I., Sharp W.D., & Vuille M. (2007) Evidence of rainfall variations in Southern Brazil from trace element ratios (Mg/Ca and Sr/Ca) in a Late Pleistocene stalagmite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **71**, 2250–2263.
- Cruz-Jr F.W., J B.S., Karmann I., Sharp W.D., Vuille M., & Ferrari J.A. (2006) A stalagmite record of changes in atmospheric circulation and soil processes in the Brazilian subtropics during the Late Pleistocene. *Quaternary Science Reviews*, **25**, 21–22.
- Dominguez J.M.L., Bittencourt A.C.S.P., & Martin L. (1981) Esquema evolutivo da sedimentação Quaternária nas feições deltaicas dos rios São Francisco (SE/AL), Jequitinhonha (BA), Doce (ES) e Paraíba do Sul (RJ). *Revista Brasileira de Geociências*, **11**, 227–237.
- Drummond A.J. & Rambaut A. (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, **7**, 214.
- Emmons L.H. & Feer F. (1990) *Neotropical Rainforest mammals: a field guide*. University of Chicago Press, Chicago.
- Emmons L.H. & Feer F. (1997) *Neotropical Rainforest mammals: a field guide*. University of Chicago Press, Chicago.
- Emmons L.H., Leite Y.L.R., Kock D., & Costa L.P. (2002) A review of the named forms of *Phyllomys* (Rodentia: Echimyidae) with the description of a new species from coastal Brazil. *American Museum Novitates*, **3380**, 1–40.
- Endler J.A. (1977) *Geographic Variation, Speciation, and Clines*. Princeton University Press, Princeton.

- Fabre P.-H., Galewski T., Tilak M., & Douzery E.J.P. (2013) Diversification of South American spiny rats (Echimyidae): a multigene phylogenetic approach. *Zoologica Scripta*, **42**, 117–134.
- Galewski T., Mauffrey J.-F., Leite Y.L.R., Patton J.L., & Douzery E.J.P. (2005) Ecomorphological diversification among South American spiny rats (Rodentia; Echimyidae): a phylogenetic and chronological approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **34**, 601–615.
- Geise L., Pereira L.G., Bossi D.E.P., & Bergallo H.G. (2004) Pattern of elevational distribution and richness of non volant mammals in Itatiaia National Park and its surroundings, in southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, **64**, 599–612.
- Gittenberger E. (1991) What about non-adaptive radiation? *Biological Journal of the Linnean Society*, **43**, 263–272.
- Glor R.E. (2010) Phylogenetic insights on adaptive radiation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **41**, 251–270.
- Gonçalves P.R. & de Oliveira J.A. (2014) An integrative appraisal of the diversification in the Atlantic forest genus *Delomys* (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae) with the description of a new species. *Zootaxa*, **3760**, 1–38.
- Grazziotin F.G., Monzel M., Echeverrigaray S., & Bonatto S.L. (2006) Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Ecology*, **15**, 3969–3982.
- Haffer J. (1969) Speciation in Amazonian Forest birds. *Science*, **165**, 131–137.
- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., & DeWaard J.R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences*, **270**, 313–321.
- Iack-Ximenes G.E., de Vivo M., & Percequillo A.R. (2005) A new species of *Echimy*s Cuvier, 1809 (Rodentia, Echimyidae) from Brazil. *Papéis Avulsos de Zoologia*, **45**, 51–60.
- IUPAC (1974) Abbreviations and symbols for nucleic acids, polynucleotides and their constituents. *Pure and Applied Chemistry*, **40**, 227–331.
- Ivanova N. V, Zemlak T.S., Hanner R.H., & Hebert P.D.N. (2007) Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*, **7**, 544–548.

- Jackson J.F. (1978) Differentiation in the genera *Enyalius* and *Strobilurus* (Iguanidae): implications for Pleistocene climatic changes in eastern Brazil. *Arquivos de Zoologia*, **30**, 1–79.
- Kinzey W.G. (1982) Distribution of some Neotropical primates and the model of Pleistocene forest refugia. *The Biological Model of Diversification in the Tropics* (ed. by G.T. Prance), Columbia University Press, Washington.
- Kozak K.H., Weisrock D.W., & Larson A. (2006) Rapid lineage accumulation in a non-adaptive radiation: phylogenetic analysis of diversification rates in eastern North American woodland salamanders (Plethodontidae: *Plethodon*). *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences*, **273**, 539–546.
- Lara M.C., Geise L., & Schneider C.J. (2005) Diversification of small mammals in the Atlantic Forest of Brazil: testing the alternatives. *Mammalian Diversification: From Chromosomes to Phylogeography (A Celebration of the Career of James L. Patton)* (ed. by E.A. Lacey and P. Myers), pp. 311–333. University of California Press, Berkeley.
- Leite Y.L. (2003) *Evolution and Systematics of the Atlantic Tree Rats, Genus Phyllomys (Rodentia, Echimyidae), with Description of Two New Species*. University of California Press, Berkeley.
- Leite Y.L.R., Christoff A.U., & Fagundes V. (2008) A new species of Atlantic Forest Tree Rat, genus *Phyllomys* (Rodentia, Echimyidae) from southern Brazil. *Journal of Mammalogy*, **89**, 845–851.
- Leite Y.L.R., Lóss S., Rego R.P., Costa L.P., & Bonvicino C.R. (2007) The rediscovery and conservation status of the Bahian giant tree rat *Phyllomys unicolor* (Mammalia: Rodentia: Echimyidae) in the Atlantic forest of Brazil. *Zootaxa*, **1638**, 51–57.
- Loss A.C. & Leite Y.L.R. (2011) Evolutionary diversification of *Phyllomys* (Rodentia: Echimyidae) in the Brazilian Atlantic Forest. *Journal of Mammalogy*, **92**, 1352–1366.
- Loss A.C., Moura R.T., & Leite Y.L.R. (2014) Unexpected phylogenetic relationships of the painted tree rat *Callistomys pictus* (Rodentia: Echimyidae). *Natureza on Line*, **12**, 132–136.
- Martin L., Suguio K., & Flexor J.M. (1993) As flutuações de nível do mar durante o quaternário superior e a evolução geológica de “deltas” brasileiros. *Boletim IG-USP. Publicação Especial*, **15**, 1–186.

- Martins F.M., Ditchfield A.D., Meyer D., & Morgante J.S. (2007) Mitochondrial DNA phylogeography reveals marked population structure in the common vampire bat, *Desmodus rotundus* (Phyllostomidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, **45**, 372–378.
- Mayden R.L. (1997) A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. *Species: the Units of Diversity* (ed. by M.F. Claridge, H.A. Dawah, and M.R. Wilson), pp. 381–423. Chapman and Hall, London.
- Mayrose I., Friedman N., & Pupko T. (2005) A gamma mixture model better accounts for among site rate heterogeneity. *Bioinformatics*, **21**, 151–158.
- Moojen J. (1952) *Os Roedores do Brasil*. Instituto Nacional do Livro, Rio de Janeiro.
- Olivares A.I. & Verzi D.H. (2014) Systematics, phylogeny and evolutionary pattern of the hystricognath rodent *Eumysops* (Echimyidae) from the Plio–Pleistocene of southern South America. *Historical Biology: an International Journal of Paleobiology*, 1–20.
- Oliveira-Filho A.T. & Fontes M.A. (2000) Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in southeastern Brazil and the influence of climate. *Biotropica*, **32**, 793–810.
- Olmos F. (1997) The Giant Atlantic Forest Tree Rat *Nelomys thomasi* (Echimyidae): a Brazilian insular endemic. *Mammalia*, **61**, 130–134.
- Patterson B.D. & Velazco P.M. (2008) Phylogeny of the rodent genus *Isothrix* (Hystricognathi, Echimyidae) and its diversification in Amazonia and the eastern Andes. *Journal of Mammalian Evolution*, **15**, 181–201.
- Patton J.L. & Rogers M.A. (1983) Systematic implications of non-geographic variation in spiny rat genus *Proechimys* (Echimyidae). *Zeitschrift fuer Saeugetierkunde*, **48**, 363–370.
- Patton J.L., Silva M.N., & Malcolm J.R. (2000) Mammals of the Rio Juruá and the evolutionary and ecological diversification of Amazonia. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, **244**, 1–306.
- Pellegrino K.C.M., Rodrigues M.T., Waite A.N., Morando M., Yassuda Y.Y., & Sites J.W. (2005) Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwini* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society*, **85**, 13–26.

- Pessenda L.C.R., Oliveira P.E., Mofatto M., Medeiros V.B., Garcia R.J.F., Aravena R., Bendassolia J.A., Leite A.Z., Saad A.R., & Etchebehereb M.L. (2009) The evolution of a tropical rainforest/grassland mosaic in southeastern Brazil since 28,000 14C yr BP based on carbon isotopes and pollen records. *Quaternary Research*, **71**, 437–452.
- Pinheiro P.S. & Geise L. (2008) Non-volant mammals of Picinguaba, Ubatuba, state of São Paulo, southeastern Brazil. *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão*, **23**, 51–59.
- Rundell R.J. & Price T.D. (2009) Adaptive radiation, nonadaptive radiation, ecological speciation and nonecological speciation. *Trends in Ecology and Evolution*, **24**, 394–399.
- Saadi A. (1993) Neotectônica da plataforma brasileira: esboço e interpretação preliminares. *Geonomos*, **1**, 1–15.
- Saadi A. (1995) A geomorfologia da Serra do Espinhaço em Minas Gerais e de suas margens. *Geonomos*, **3**, 41–63.
- Saia S.E.M.G., Pessenda L.C.R., Gouveia S.E.M., Aravena R., & Bendassolli J.A. (2008) Last glacial maximum (LGM) vegetation changes in the Atlantic Forest, southeastern Brazil. *Quaternary International*, **184**, 195–201.
- Seehausen O. (2004) Hybridization and adaptive radiation. *Trends in Ecology and Evolution*, **19**, 198–207.
- Shargal E., Rath-Wolfson L., Kronfeld N., & Dayan T. (1999) Ecological and histological aspects of tail loss in spiny mice (Rodentia: Muridae, Acomys) with a review of its occurrence in rodents. *Journal of Zoology*, **249**, 187–193.
- Silva S.M., Moraes-Barros N., Ribas C.C., Ferrand N., & Morgante J.S. (2012) Divide to conquer: a complex pattern of biodiversity depicted by vertebrate components in the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society*, **107**, 39–55.
- Smith M.F. & Patton J.L. (1993) The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine tribe. *Biological Journal of the Linnean Society*, **50**, 149–177.
- Stamatakis A. (2006) RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, **22**, 2688–2690.

- Stamatakis A. (2014) RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, **30**, 1312–1313.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., & Kumar S. (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, **30**, 2725–2729.
- Upham N.S., Ojala-Barbour R., Brito M J., Velazco P.M., & Patterson B.D. (2013) Transitions between Andean and Amazonian centers of endemism in the radiation of some arboreal rodents. *BMC Evolutionary Biology*, **13**, 1–24.
- Vaughan T.A., Ryan J.M., & Czaplewski N.J. (2014) *Mammalogy*. Jones & Bartlett Learning, Burlington.
- Vervloet R.J.H.M. & Ross J.L.S. (2012) Revisão dos conhecimentos sobre o relevo do Planalto Atlântico Brasileiro: incógnitas que ainda persistem. *Revista do Departamento de Geografia*, **23**, 187–216.
- Verzi D.H. (1999) The dental evidence on the differentiation of the ctenomyine rodents (Caviomorpha, Octodontidae, Ctenomyinae). *Acta Theriologica*, **44**, 263–282.
- Verzi D.H. (2008) Phylogeny and adaptive diversity of rodents of the family Ctenomyidae (Caviomorpha): delimiting lineages and genera in the fossil record. *Journal of Zoology*, **274**, 386–394.
- Verzi D.H., Montalvo C.I., & Deschamps C.M. (2008) Biostratigraphy and biochronology of the late Miocene of central Argentina: evidence from rodents and taphonomy. *Geobis*, **44**, 145–155.
- Verzi D.H., Olivares A.I., & Morgan C.C. (2013) Phylogeny, evolutionary patterns and timescale of South American octodontoid rodents. The importance of recognising morphological differentiation in the fossil record. *Acta Palaeontologica Polonica*, .
- Verzi D.H., Vucetich M.G., & Montalvo C.I. (1995) Un nuevo eumysopinae (Rodentia, Echimyidae) del mioceno tardío de la provincia de La pampa y consideraciones sobre la historia de la subfamilia. *Ameghiniana*, **32**, 191–195.
- Vucetich G., Vieytes E.C., Pérez M.E., & Carlini A.A. (2010) The rodents from La Cantera and the early evolution of caviomorphs in South America. *The paleontology of Gran Baranca: Evolution and Environmental Change through the Middle Cenozoic of Patagonia*. (ed. by R.H. Madden, A.A. Carlini, M.G.

- Vucetich, and R.F. Kay), pp. 193–205. Cambridge University Press, Cambridge.
- Wheeler W.C. (2012) *Systematics: a Course of Lectures*. Willey-Blackwell, West Sussex, UK.
- Wilke T., Benke M., Brändle M., Albrecht C., & Bichain J.-M. (2010) The neglected side of the coin: non-adaptive radiations in Spring Snails (*Bythinella* spp.). *Evolution in Action* (ed. by M. Glaubrecht), pp. 551–578. Springer, Berlin.
- Wilkins J.S. (2011) Philosophically speaking, how many species concepts are there? *Zootaxa*, **2765**, 58–60.
- Yoder J.B., Clancey E., Des Roches S., Eastman J.M., Gentry L., Godsoe W., Hagey T.J., Jochimsen D., Oswald B.P., Robertson J., Sarver B.A.J., Schenk J.J., Spear S.F., & Harmon L.J. (2010) Ecological opportunity and the origin of adaptive radiations. *Journal of Evolutionary Biology*, **23**, 1581–1596.

Apêndice 1. Espécimes utilizados para confecção dos mapas de distribuição de *Phyllomys* e análises moleculares com os marcadores CitB, COI, GHR, RAG1 e vWF e respectivos número de acesso do GenBank. PE indica sequências geradas no presente estudos. UTO é abreviação para unidades taxonômicas operacionais e Loc. para a localidades de ocorrência, de acordo com o Apêndice 8. Um asterisco (*) indica UTO's utilizadas nas análises de relógio molecular, dois asteriscos (**) indicam UTO's em que o material extraído para análises moleculares foi proveniente de pele, considerado como DNA antigo.

Taxa	UTO	número coletor	Loc.	CitB	COI	GHR	RAG1	vWF
<i>Phyllomys blainvillii</i>	MNRJ 4125		18					
	MNRJ 1350		5					
	MNRJ 21512		11					
	MNRJ 21516		10					
	MNRJ 21626		14					
	MNRJ 43810*	LMP 27	37	U35412	JF297683	KF590692	KF590664	JF297732
	MVZ 197568*	LPC 246	6	JF297836	JF297685	PE		JF297734
	UFMG 3014*	LPC 290	6	EF608180	JF297686	PE	PE	JF297735
	UFMG 3017*	LPC 227	17	EU313239	JF297684	PE	PE	JF297733
<i>Phyllomys brasiliensis</i>	AP 48*		41	EF608182	JF297680	PE	PE	JF297729
	MCNM 1733		42					
	MCNM 1734*		42	PE	PE	PE	PE	PE
	UZMC 81		44					
<i>Phyllomys dasythrix</i>	BMNH 0.6.29.20		131					
	BMNH 1.12.3.1		151					
	MCN-FZB 48		153					
	MCNU 828*	AC 629	154	EF608185	JF297660	PE	PE	JF297709
	MCNU 844*	AC 628	152	JF297832	JF297659	KJ742641	KJ742689	JF297708
	MNRJ 6238		149					
	MNRJ 21503		148					
<i>Phyllomys kerri</i>	MNRJ 6241		91					

<i>Phyllomys lamarum</i>	BMNH 3.9.5.96		13					
	MCNM 2275**		39	KF874585	KF874589			PE
	MCNM 2704		38	PE	PE			
	MCNM 2705		38	PE				
	MCNM 2706		38	PE				
	MCNM 2707		38	PE	PE	PE	PE	PE
	MNRJ 11259		16					
	MNRJ 11260		15					
	MZUSP 8413		2					
	UFES 284*	LPC 968	57	JF297816	JF297682	PE	PE	JF297731
	UFMG 3016*	LPC 73	40	EF608181	JF297681	PE	PE	JF297730
	UZMC 1282		13					
<i>Phyllomys lundi</i>	MNRJ 62392*	YL 07	53	EF608183	JF297672	PE	PE	JF297721
	RBPDA 2228		74					
<i>Phyllomys mantiqueirensis</i>	MNRJ 62393*	YL 23	54	EF608179	JF297671	PE	PE	JF297720
<i>Phyllomys medius</i>	BMNH 3.7.1.84		129					
	BMNH 9.11.19.27		133					
	MCN-FZB 391		150					
	MHNCI 3033		127					
	MNRJ 6237		70					
	MNRJ 31561		51					
	MS 92		138					
	MZPUCPR 129		132					
	MZUSP 7716		125					
	MZUSP 7717		126					
	MZUSP 10629		120					
	UFSC 63		144					

	UFSC 416	140						
<i>Phyllomys nigrispinus</i>	AB 527	117						
	B 48	97	PE	PE				
	B 50	106						
	B 374	106	JF297808	JF297666				JF297715
	B 435	110						
	B 539	100	PE	PE				
	B 697	110						
	B 723*	112	JF297809	JF297667	PE	PE		JF297716
	B 733	115	JF297810	JF297668				JF297717
	BOCA 299	82	PE					PE
	BOCA 335	83	PE		PE			PE
	BOCA 364	82	PE		PE	PE		PE
	BS 921	109						
	FMNH 93045	122						
	FMNH 94358	119						
	FMNH 94359	121						
	FURB 6257	136	PE	PE				PE
	MNRJ 6440	70						
	MNRJ 31522	69						
	MZUSP 175	94						
	MZUSP 664	88						
	MZUSP 1954	93						
	MZUSP 3738	84						
	MZUSP 6431	130						
	MZUSP 10311	102						
	MZUSP 25862	123						
	MZUSP 26652	95						
	MZUSP 27755	124						
	NMW B 918	92						
	NSV 160599*	90	EU313243	JF297669	PE	PE		JF297718

	RG 1969	AB 740	118	JF297811	JF297670			JF297719
	SS 51**		101	PE				
	SS 87**		98	PE				
	UFMG 948		105					
	UFSC 4849	1090 (tecidos UFSC)	137	PE	PE			
	UFSC 4915	P 462	142	PE	PE	PE	PE	
<i>Phyllomys pattoni</i>	BMNH 5.4.16.4		78					
	BMNH 5.4.16.5		78					
	CIT 808	VF 19	26	Leite, 2003	PE			
	DL 19		71	PE	PE			PE
	DL 20		71	PE	PE			PE
	DL 21		71	PE	PE			PE
	FS 11-52		72	PE	PE			
	FS 14-11*		72	JF297826	JF297700	PE	PE	JF297749
	GABF 97P		46					
	HGB 36		33	JF297837	JF297693			JF297742
	HGB 585*		81	JF297825	JF297699	PE	PE	JF297748
	IG 34		81					
	MBML 1856		59					
	MBML 2011		61	Leite, 2003	PE			
	MBML 2032		61	Leite, 2003	PE			
	MBML 2047		61	Leite, 2003	PE			
	MBML 2203		62					
	MBML 226		64					
	MCNM 2156**		66	PE				
	MNRJ 10452		24					
	MNRJ 11252		80					
	MNRJ 11253		21					
	MNRJ 11254		25					
	MNRJ 1933		69					
	MNRJ 21508		77					

MNRJ 21517		20					
MNRJ 22264		23					
MNRJ 22265		23					
MNRJ 2232		70					
MNRJ 31562		81					
MNRJ 31564		68					
MNRJ 33515		22					
MNRJ 4077		52					
MNRJ 42978	FU 20	73	Leite, 2003				
MNRJ 62391*	YL 197	27	EF608187	JF297695	KJ742606	KJ742690	JF297744
MNRJ 6449		79					
MNRJ 8195		9					
MNRJ 8276		56					
MVZ 183139	MAM 40	67	Leite, 2003	PE			
MVZ 197621	YL 195	27	JF297838	JF297694			JF297743
MZUSP 138		86					
MZUSP 26718		81					
MZUSP 31953	YL 198	32	JF297839	JF297696			JF297745
PHA 628*		12	PE	PE	PE	PE	PE
RM 238		19	PE	PE			
SLF 9		34	JF297829	JF297703			JF297752
UFPB 774		3					
UFES 28	YL 263	60	PE	PE			
UFES 29	YL 294	60	PE	PE			
UFES 30	YL 298	60	PE	PE			
UFES 31	YL 301	60	PE	PE			
UFES 32	YL 305	60	PE	PE			
UFES 33	YL 308	60	PE	PE			
UFES 42	YL 287	60	PE	PE			
UFES 43*	YL 300	60	JF297823	JF297697	PE	PE	JF297746
UFES 96	SLF 62	28	JF297831	JF297705			JF297754
UFES 97	SLF 94	34	PE	PE			PE

	UFES 98	SLF 73	29	PE	PE			PE
	UFES 99		35					
	UFES 120*	SLF 57	30	JF297830	JF297704	PE	PE	JF297753
	UFES 121	SLF 60	31	PE	PE			
	UFES 122	SLF 63	28		PE			
	UFES 439	LPC 1215	63	PE	PE			
	UFES 440	LPC 1238	63	JF297828	JF297702			JF297751
	UFES 620*	LPC 1105	63	JF297827	JF297701	PE	PE	JF297750
	UFES 621	LPC 1167	63	PE	PE			
	UFES 622	LPC 1223	63	PE	PE			
	UFES 623	LPC 1236	63	PE	PE			
	UFES 624	LPC 1251	63	PE	PE			
	UFES 908	YL 276	60	PE	PE			
	UFES 909	YL 235	61	PE	PE			
	UFES 910	YL 564	61	PE	PE			
	UFES 911	YL 563	61	JF297824	JF297698			JF297747
	UFES 2461	YL 780	58	PE				
	UFMG 2268	LPC 32	55	PE	PE			
	UFPB 346		65					
	UFV 379		49					
	UFV 385		50					
	UFV 696		50	Leite, 2003	PE			
	USNM 583932	YL 196	27	Leite, 2003	PE			
	YL 199		32	Leite, 2003	PE			
	YL 200		32	Leite, 2003	PE			
	YL 201		32	Leite, 2003	PE			
<i>Phyllomys sulinus</i>	AB 490		116	JF297805	JF297661			JF297710
	AC 632		147	Leite, 2003				
	B 304*		108	JF297806	JF297662			JF297711
	B 407		111	PE	PE			
	B 554		99	PE	PE			

	B 641		108	PE	PE			
	BMNH 50.7.8.24		141					
	BOCA 291		82	PE		PE	PE	PE
	BS 307**		104	PE				
	BS 814**		109	PE				
	BS 1066**		103	PE				
	CIT 1346		146	PE	PE			PE
	FURB 5193		136	PE	PE			PE
	FURB 5239		136		PE			PE
	FURB 5521		136	PE	PE			PE
	FURB 6064		136	PE	PE			PE
	FURB 6503		136	PE	PE			PE
	FURB 18732		139	PE	PE	PE	PE	PE
	MCNU 826		146	PE	PE			PE
	MCNU 833*	CIT 1344 / AUC 1427	146	JF297833	JF297663	PE	PE	JF297712
	MCNU 837	CIT 1357 / AUC 764	146	JF297834	JF297664			JF297713
	MHNCI 2599		128					
	MZUSP 8885		85					
	UFPB JCV28		145					
	UFSC 4214	898 (tecidos UFSC)	143	PE				
	USNM 460569		96					
<i>Phyllomys thomasi</i>	MZUSP 2148		114					
	MZUSP 2149		114					
	MZUSP 2151		114					
	MZUSP 3197		114					
	MZUSP 3198		113					
<i>Phyllomys unicolor</i>	SMF 4319		33					
<i>Phyllomys</i> sp. 1	UFMG 2486	LGV 34	43	JF297812	JF297676			JF297725
	UFMG 2487*	LGV 35	43	JF297813	JF297677	PE	PE	JF297726

	UFMG 2488	LGV 37	43	JF297814	JF297678			JF297727
	UFMG 2489*	LGV 38	43	JF297815	JF297679	PE	PE	JF297728
<i>Phyllomys</i> sp. 2	DAM 175		8	JF297817	JF297687			JF297736
	DAM 179		8	JF297818	JF297688			JF297737
	PHA 355*		8	JF297819	JF297689	PE	PE	JF297738
	PHA 356		8	JF297820	JF297690			JF297739
	PHA 357		8	JF297821	JF297691			JF297740
	PHA 358*		7	JF297822	JF297692	PE	PE	JF297741
	UFPB 5690	BC 06	1					
	UFPB 5922	BC 212	4	PE	PE	PE	PE	
<i>Phyllomys</i> sp. 3	FS 6-43*		75	JF297835	JF297673	PE	PE	JF297722
	FS 12-03		76	EU313247	JF297674		PE	JF297723
	FS 12-30*		76	EF608184	JF297675	PE	PE	JF297724
<i>Phyllomys</i> sp. 4	BAR 28*		36	PE	PE	PE	PE	PE
	MCNM 2027*		47	KF874586	KF874590	PE	PE	PE
	MCNM 2153**		45	PE	PE			
	MCNM 2709*		48	KF874587	KF874591	PE	PE	PE
<i>Phyllomys</i> sp. 5	EEB 734		87	Abreu- Júnior, 2013				
	EEB 751*		87	Abreu- Júnior, 2013	PE	PE	PE	PE
	PSP 51**		89	PE				
<i>Phyllomys</i> sp. 6	FURB 12073*		135	PE	PE	PE	PE	PE
	FURB 12108		135	PE		PE	PE	PE
	FURB 12362		134	PE	PE			PE
	FURB 12367		134	PE	PE			PE
	FURB 12370		134	PE	PE			PE
	FURB 12376		134	PE	PE			PE

	FURB 12377	134	PE	PE		PE	
	FURB 12413	134	PE	PE		PE	
	FURB 12418	134	PE	PE		PE	
	FURB 12430	134	PE	PE		PE	
	FURB 12436	134	PE	PE		PE	
	FURB 12437	134	PE	PE		PE	
Grupos Externos							
	<i>Callistomys pictus</i> *		KJ742659		KJ742627	KJ742677	KJ742614
	<i>Capromys pilorides</i> *		AF422915		AF433950	JX515322	AJ251142
	<i>Clyomys laticeps</i> *		AF422918		JX515326	KJ742679	AJ849306
	<i>Echimys chrysurus</i> *		PE	PE	PE	PE	AJ251141
	<i>Euryzgomatomys spinosus</i> *		EU544667		JX515327	KJ742680	AJ849319
	<i>Makalata didelphoides</i> *		EU313232	JF297658	PE	PE	JF297707
	<i>Mesomys hispidus</i> *		L23385		JX515335	EU313322	AJ849305
	<i>Myocastor coypus</i> *		EU544663		AF520662	AY011892	AJ251140
	<i>Proechimys cuvieri</i> *		AJ251400		KF590693	KF590665	KF590675
	<i>Thrichomys apereoides</i> *		EU544668		JX515325	EU313334	AJ849315
	<i>Trinomys yonenagae</i> *		U35172		PE	PE	PE
	<i>Abracoma bennettii</i> *		AF244387		FJ855213	JN633625	AJ251143
	<i>Chichilla lanigera</i> *		AF464760		AF332036	KF590658	AJ238385
	<i>Ctenomys coihaiquensis</i> *		AF119112		KF590678	KF590659	KF590666
	<i>Octodontomys gliroides</i> *		AF370706		AF520649	KF590663	KF590672

Siglas das coleções:

BMNH = British Museum of Natural History, Londres, Inglaterra; FMNH = Field Museum of Natural History, Chicago, EUA; FURB = Coleção Zoológica, Fundação Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, Santa Catarina, Brasil; MBML = Museu de Biologia Professor Mello Leitão, Santa Teresa, Espírito Santo, Brasil; MCN-FZB = Museu de Ciências Naturais, Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil; MCNM = Museu de Ciências Naturais, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil; MCNU = Museu de Ciências Naturais, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, Rio Grande do Sul, Brasil; MHNCl = Museu de História Natural Capão da Imbuia, Curitiba, Brasil; MNRJ = Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil; MVZ = Museum of Vertebrate Zoology, University of California, Berkeley, EUA; MZPUCPR = Museu de Zoologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil; MZUSP = Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil; NMW = Naturhistorisches Museum, Viena, Áustria; SMF = Senckenberg Museum, Frankfurt, Alemanha; UFES = Coleção de Mamíferos, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brasil; UFMG = Coleção de

Mamíferos do Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil; UFPB = Coleção do Departamento de Sistemática e Ecologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil; UFSC = Coleção Científica de Mamíferos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil; UFV = Museu de Zoologia João Moojen de Oliveira, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil; USNM = Smithsonian National Museum of Natural History, D.C, EUA; UZMC = Universitæts Zoologisk Museum, Copenhagen, Dinamarca.

Material não tombado, iniciais e números de campo referente aos seguintes coletores:

R. Pardini (AB, B, BS, RG, SS); A. Christoff (AC); A. Paglia (AP); A. Paz e E.M. Vieira (BAR); Y. Yonenaga-Yassuda e V. Fagundes (CIT); A.C. Delciellos (BOCA); D.A. Moraes (DAM); D. Loretto (DL); A.R. Percequillo (EEB); L. Geise (FS, IG, PSP); G.A.B. Fonseca (GABF); H.G. Bergallo (HGB); M. Steindel (MS); J.C. Voltolini (NSV); P.H. Asfora (PHA); P.P. de Oliveira (RBPDA); R. Moura (RM); S.L. Freitas (SLF); Y. Leite (YL).

Apêndice 2. Protocolo de extração de DNA utilizando kit DNAeasy Blood & Tissue da Qiagen a partir de amostra de museu modificado de Bi et al. 2013.

1. Com o auxílio de um bisturi estéril, corte um pedaço da pele e coloque em um tubo de 1,5mL estéril previamente identificado.

Utilize luz UV por 30 minutos para esterilizar os tubos.

Os melhores locais para retiradas das amostras são as almofadas das patas e os lábios. Quanto menos pelo melhor, pois eles podem entupir a coluna de purificação e atrapalhar o processo de extração. O tamanho do pedaço pode ser de cerca de 2 × 2 mm. O ideal é descartar a primeira camada e usar camadas mais internas, para evitar contaminação.

2. Retire o excesso de pelos do tecido com um bisturi estéril descartável.

Não há necessidade de realizar este procedimento se forem utilizadas as almofadas das patas.

Para cada amostra, uma nova lâmina de bisturi deve ser utilizada.

3. Lave duas vezes o tecido com tampão 1× STE , descartando o tampão a cada lavagem.

Tampão 1× STE contém 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA e 100mM NaCl.

A lavagem dos tecidos consiste em passar o tubo no vortex com 1× STE por alguns segundos. Remova o líquido. Não há problema em descartar o STE da primeira lavagem, mas pipete para retirar todo o líquido depois da segunda lavagem, antes de fragmentar o tecido.

4. Cortar o tecido utilizando bisturi estéril e descartável.

O método mais fácil consiste em lavar o tecido duas vezes, transferir para um novo tubo estéril (esterilizar previamente na luz UV por 30 minutos) e cortar o tecido dentro do tubo em aproximadamente 8 pedaços com uma lâmina de bisturi estéril descartável.

5. Adicione 180 µL de tampão ATL e 20 µL Proteinase K.

6. Passar o tubo no vórtex por 15 segundos e colocar a 56° C, de preferência em uma incubadora com agitação, por 2 horas ou overnight adicionando 20 µl Proteinase K a cada 6-8 horas até o tecido estar completamente digerido (adicionando no máximo 80 µL de Proteinase K).

Incubadora com rotor “rotisseries” são melhores que “shakers” ou plataformas, mas assegure-se que os tubos estão bem vedados para não vazarem material.

Se não tiver incubadora com agitação, pode usar banho seco ou banho maria, lembrando de passar no vórtex sempre que possível (a cada 30 minutos).

A digestão completa do tecido é verificada quando a solução de lise está limpa, exceto pela presença de alguns pelos restantes.

7. **Passar os tubos no vórtex por 15 segundos.**
8. **Dilua o tampão AE em 1:10 (1 volume de AE + 9 volumes de água) utilizando água estéril, e coloque o tampão diluído no banho-maria ou na estufa a 70°C.**
9. **Adicione 200 µL de tampão AL em cada tubo de tecido digerido.**
10. **Passar os tubos no vórtex por 5-10 segundos.**
11. **Adicione 200 µL de etanol 100 % às amostras.**
12. **Passar os tubos no vórtex por 5-10 segundos.**
13. **Pipete a mistura dos tubos nas colunas de purificação.**
14. **Centrifugue os tubos a 8.000 rpm por 1 minuto.**
15. **Descarte o tubo coletor e substitua-o por um novo.**
16. **Adicione 500 µL de tampão AW1.**
17. **Centrifugue os tubos a 8.000 rpm por 1 minuto.**
18. **Descarte o tubo coletor e substitua-o por um novo.**
19. **Adicione 500 µL de tampão AW2.**
20. **Centrifugue os tubos a 14.000 rpm por 3 minutos.**
21. **Descarte o tubo coletor e substitua-o por um novo tubo de 1,5 mL estéril identificado (esterilize o tubo previamente em luz UV por 30 minutos).**

Os tubos podem ser identificados com o nome da amostra e "1°" (indicando que é a primeira eluição).
22. **Adicione 100 µL do tampão AE 1:10 pré-aquecido a cada coluna.**
23. **Deixe descansar em temperatura ambiente por 15 minutos.**
24. **Centrifugue os tubos a 8.000 rpm por 1 minuto.**
25. **Transferir as colunas para um novo tubo estéril de 1,5 mL identificado.**

Os tubos podem ser identificados com o nome da amostra e "2°" (indicando que é a segunda eluição).

26. Adicione 100 µL do tampão AE 1:10 pré-aquecido a cada coluna.

27. Deixe descansar em temperatura ambiente por 15 minutos.

28. Centrifugue os tubos a 8.000 rpm por 1 minuto.

A segunda eluição geralmente apresenta concentração muito baixa. Usar preferencialmente a primeira eluição, mas pode concentrar a segunda caso seja necessário utilizar mais material e não haja suficiente para uma outra extração.

29. Descarte as colunas.

30. Armazene os tubos de 1,5 ml no congelador à -20° C ou menos, antes de realizar qualquer reação.

Apêndice 3. Condições de PCR e combinação de *primers* utilizados para amplificação de sequências de *Phyllomys* e grupos externos.

marcador	combinação de <i>primers</i>	tamanho aproximado do fragmento	posição no gene (pb)	Referência <i>primers</i>
CitB	MVZ05–MVZ04 ¹	427 pb	0-427	Smith & Patton, 1993
	MVZ05–MVZ16 ¹	825 pb	0-825	Smith & Patton, 1993
	MVZ127*–MVZ16 ¹	386 pb	439-825	*Leite & Patton, 2002
COI	LCO–HCO ²	~ 657 pb	49-705	Hebert et al., 2003
	LepF1_t1, VF1d_t1, LepR1_t1 e VR1d_t1 adicionadas de uma cauda M13 ²	~ 657 pb	49-705	Ivanova et al., 2007
exon 10 GHR	GHR50F–GHREND ³	891 pb	0-891	Adkins et al., 2001
exon 28 vWF	V10–W13 ⁵	498 pb	44-542	Galewski et al., 2005
	V2–W1 ⁶	954 pb	304-1258	Huchon et al., 1999
RAG1	RAG1F1705–FMNH2b ⁴	706 pb	0-706	Teeling et al., 2000 / Patterson & Velazco, 2008

¹ desnaturação inicial a 94 °C por 5 min; 39 ciclos [desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 48 °C por 45 s e extensão a 72 °C por 45 s]; e extensão final a 72 °C por 5 min.

² desnaturação inicial a 94 °C por 5 min; 40 ciclos [desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 44 °C por 45 s e extensão a 72 °C por 45 s]; e extensão final a 72 °C por 5 min.

³ desnaturação inicial a 95 °C por 5 min; 5 ciclos [desnaturação a 95 °C por 1 min, anelamento a 61 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min]; quatro blocos de 5 ciclos com as mesmas condições de desnaturação e extensão do ciclo anterior, mas com temperaturas de anelamento 2 °C mais baixas a cada ciclo (59, 57, 55 e 53 °C); um bloco com 10 ciclos condições de desnaturação e extensão do ciclo anterior e anelamento a 53 °C; e extensão final a 72 °C por 10 min.

⁴ desnaturação inicial a 94 °C por 5 min; 39 ciclos [desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 58 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min]; e extensão final a 72 °C por 10 min.

⁵ desnaturação inicial a 94 °C por 5 min; 36 ciclos [desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 55 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 30 s]; e extensão final a 72 °C por 5 min.

⁶ desnaturação inicial a 94 °C por 5 min; 30 ciclos [desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 60 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 30 s]; e extensão final a 72 °C por 5 min.

Adkins R.M., Gelke E.L., Rowe D., & Honeycutt R.L. (2001) Molecular phylogeny and divergence time estimates for major rodent groups: evidence from multiple genes. *Molecular Biology and Evolution*, **18**, 777–791.

Galewski T., Mauffrey J.-F., Leite Y.L.R., Patton J.L., & Douzery E.J.P. (2005) Ecomorphological diversification among South American spiny rats (Rodentia; Echimyidae): a phylogenetic and chronological approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **34**, 601–615.

- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., & DeWaard J.R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **270**, 313–321.
- Huchon D., Catzeflis F.M., & Douzery E.J. (1999) Molecular evolution of the nuclear von Willebrand factor gene in mammals and the phylogeny of rodents. *Molecular biology and evolution*, **16**, 577–589.
- Ivanova N. V, Zemlak T.S., Hanner R.H., & Hebert P.D.N. (2007) Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*, **7**, 544–548.
- Leite Y.L.R. & Patton J.L. (2002) Evolution of South American spiny rats (Rodentia, Echimyidae): the star-phylogeny hypothesis revisited. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **25**, 455–464.
- Smith M.F. & Patton J.L. (1993) The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine tribe. *Biological Journal of the Linnean Society*, **50**, 149–177.
- Patterson B.D. & Velazco P.M. (2008) Phylogeny of the rodent genus *Isothrix* (Hystricognathi, Echimyidae) and its diversification in Amazonia and the eastern Andes. *Journal of Mammalian Evolution*, **15**, 181–201.
- Teeling E.C., Scally M., Kao D.J., Romagnoli M.L., Springer M.S., & Stanhope M.J. (2000) Molecular evidence regarding the origin of echolocation and flight in bats. *Nature*, **403**, 188–192.

Apêndice 4. Modelos de evolução selecionados pelo critério de informação Bayesiano (BIC) para as análises moleculares de *Phyllomys*, incluindo os grupos externos. O marcador COI não foi utilizado nas análises de relógio molecular, portanto o cálculo do modelo para esse marcador não se aplica a essa análises (na).

marcador	número máximo de UTO's	modelos de evolução BIC		
		todas UTO's	análise concatenada 36 UTO's	relógio molecular 50 UTO's
CitB	143	HKY + G	GTR + G	GTR + G
COI	127	HKY + G	GTR + G	na
GHR	44	K80 + G	GTR + G	SYM + G
RAG1	44	K80 + G	K80 + G	K80 + G
vWF	88	HKY + G	HKY + G	HKY + G

Apêndice 5. Filogenias bayesianas de espécies de *Phyllomys*, construídas com marcadores moleculares concatenados (CitB, COI, GHR, RAG1 e vWF) e individuais.

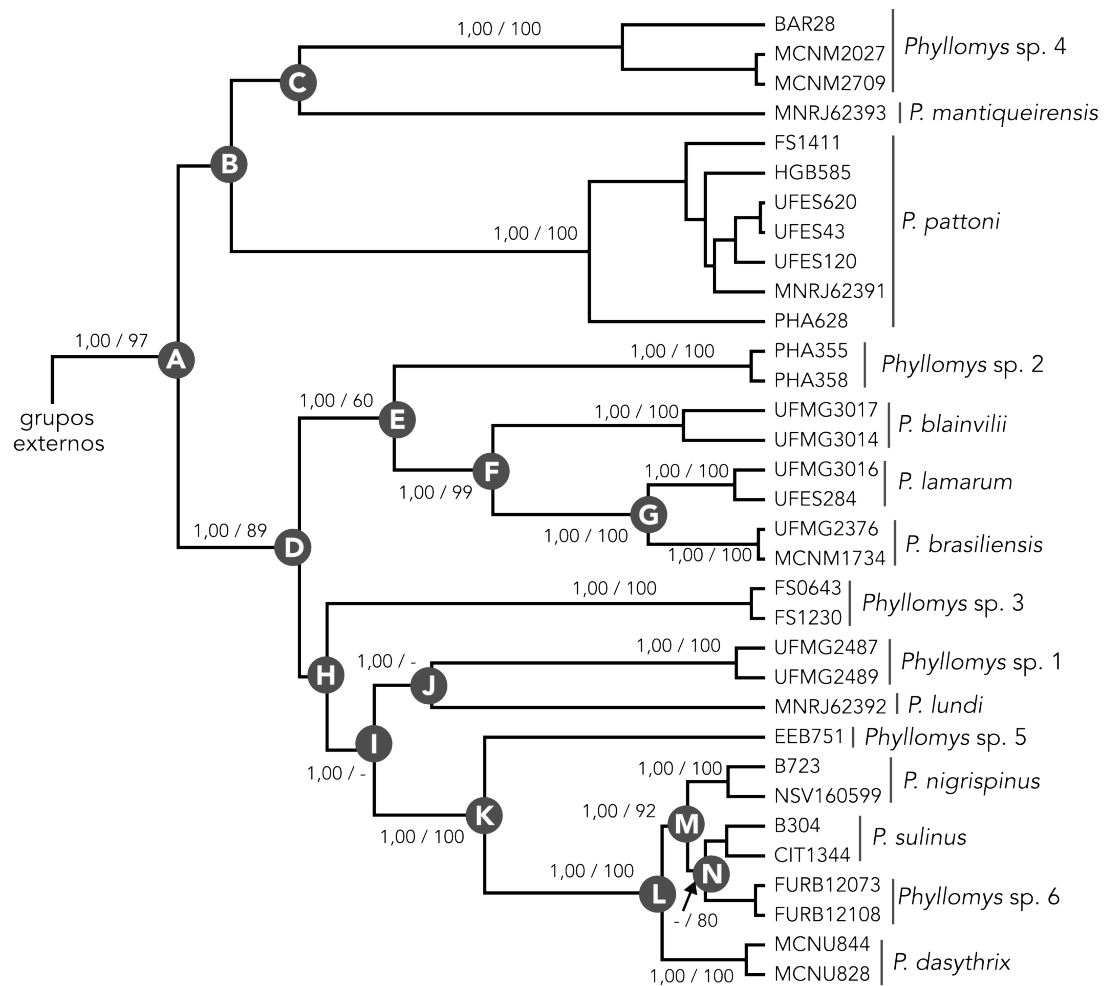


Figura 1. Árvore de inferência bayesiana de espécies de *Phyllomys*, construída com sequências de CitB, COI, GHR, RAG1 e vWF. Clados estão identificados por letras, de acordo com a Figura 1. Valores indicam probabilidade posterior bayesiana (PPB) / *bootstrap* da máxima verossimilhança.

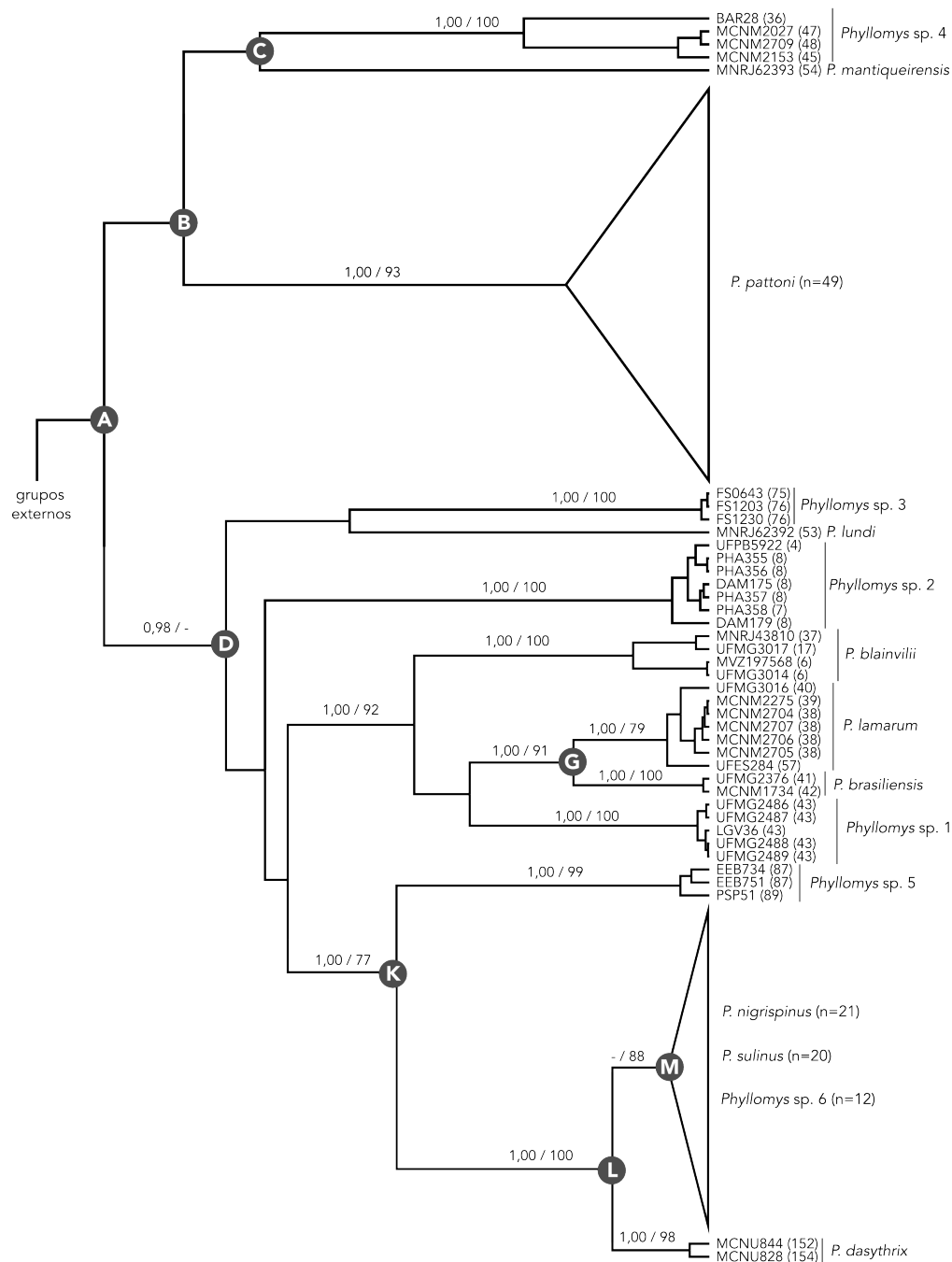


Figura II. Árvore de inferência bayesiana de espécies de *Phyllomys*, construída com sequências de CitB. Letras dentro dos círculos cinza se referem aos clados identificados na Figura 1. Valores nos ramos indicam probabilidade posterior bayesiana (PPB) / *bootstrap* da máxima verossimilhança. Números entre parênteses após cada táxon terminal indica a localidade de coleta de acordo com Apêndice 8. Para detalhamento do nó M ver Figura III e para detalhamento de *P. pattoni* ver Figura IV.

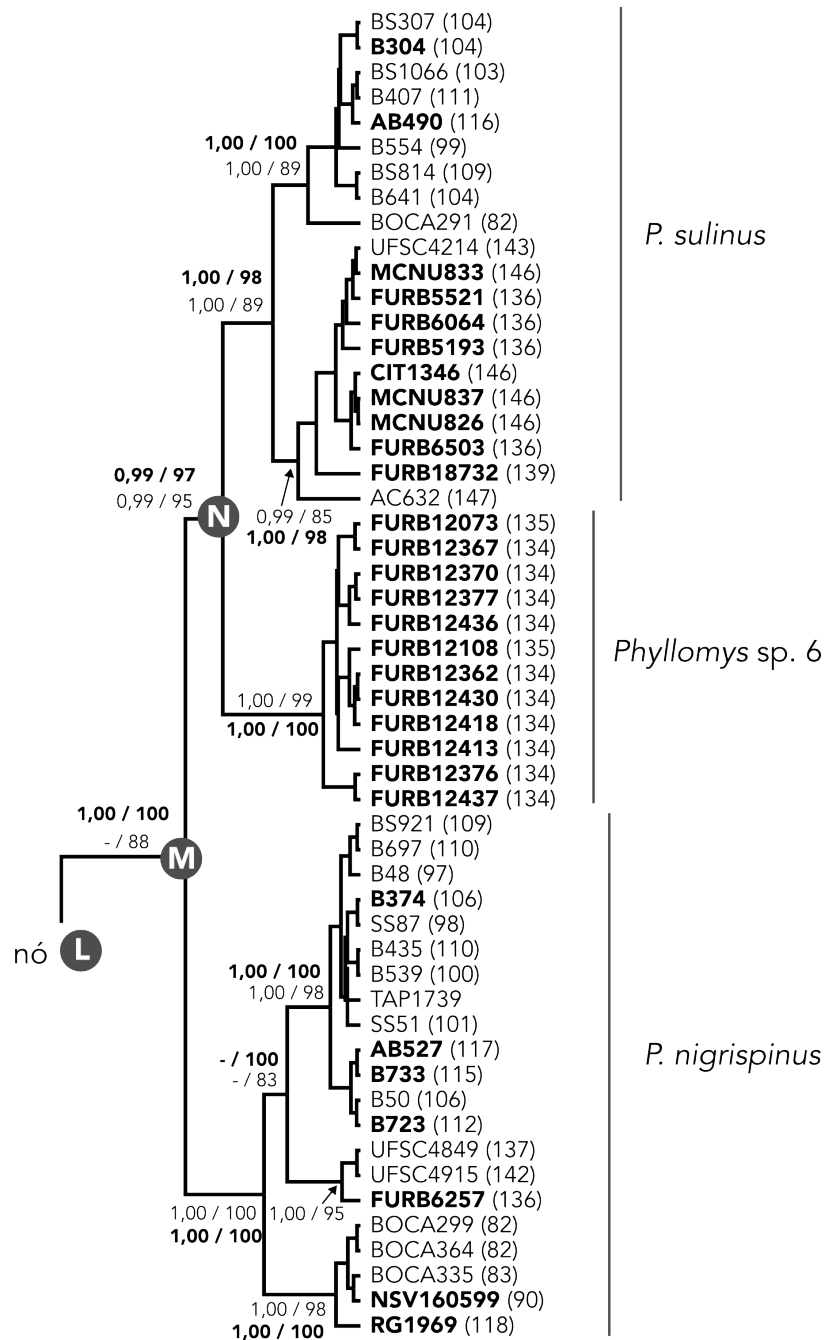


Figura III. Árvore de inferência bayesiana de espécies de *Phyllomys* construída com sequências de CitB. Valores nos ramos indicam probabilidade posterior bayesiana (PPB) / *bootstrap* da máxima verossimilhança. Táxons e valores de suporte em negrito são referentes às análises utilizando os marcadores moleculares CitB, COI e vWF concatenados. Números entre parênteses após cada táxon terminal indica a localidade de coleta de acordo com Apêndice 8 Letras dentro dos círculos cinza se referem aos nós identificados na Figura 1.

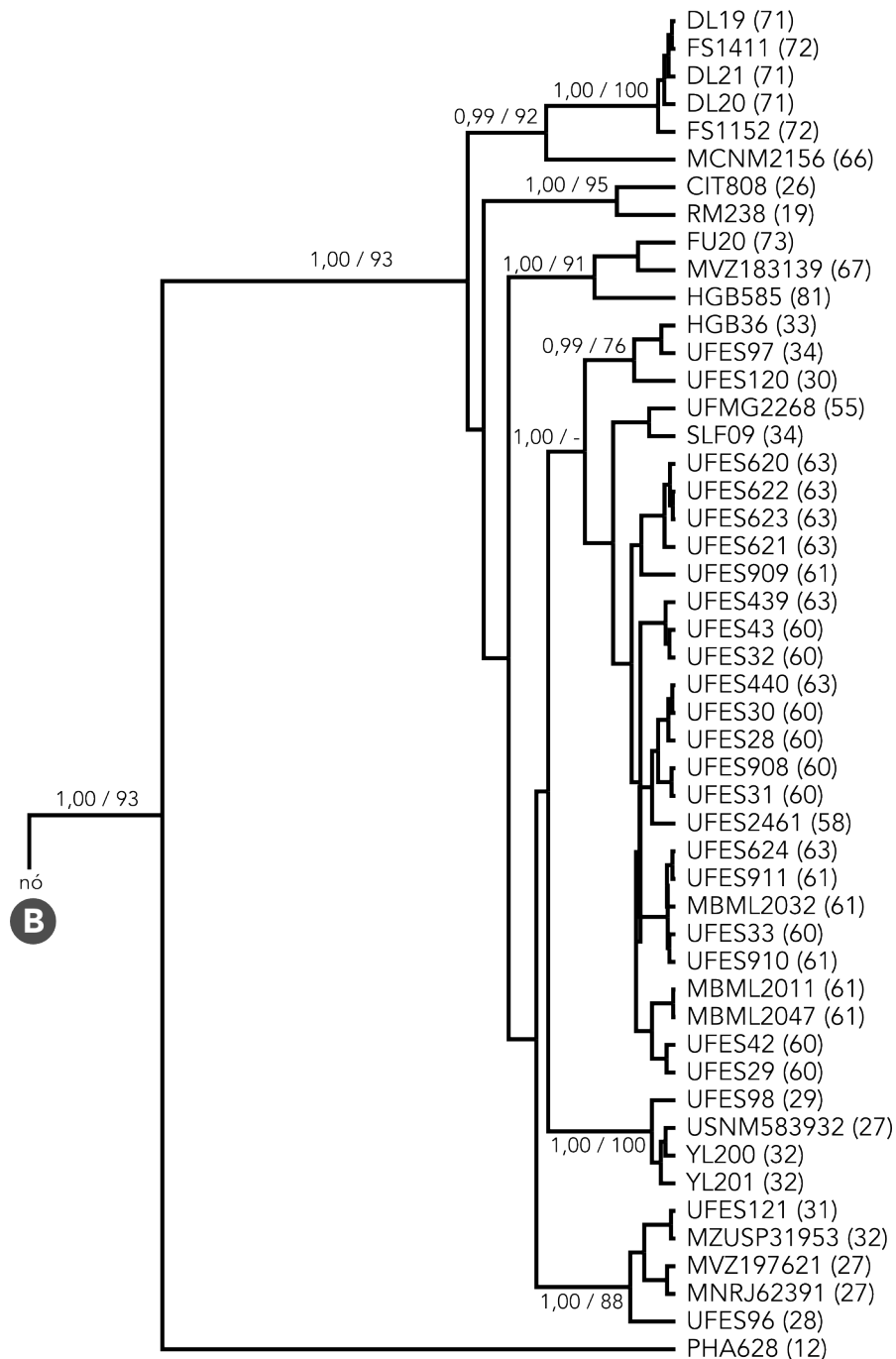


Figura IV. Árvore de inferência bayesiana de *Phyllomys pattoni* construída com sequências de CitB. Valores nos ramos indicam probabilidade posterior bayesiana (PPB) / *bootstrap* da máxima verossimilhança. Números entre parênteses após cada táxon terminal indica a localidade de coleta de acordo com Apêndice 8. Letras dentro dos círculos cinza se referem aos nós identificados na Figura 1.

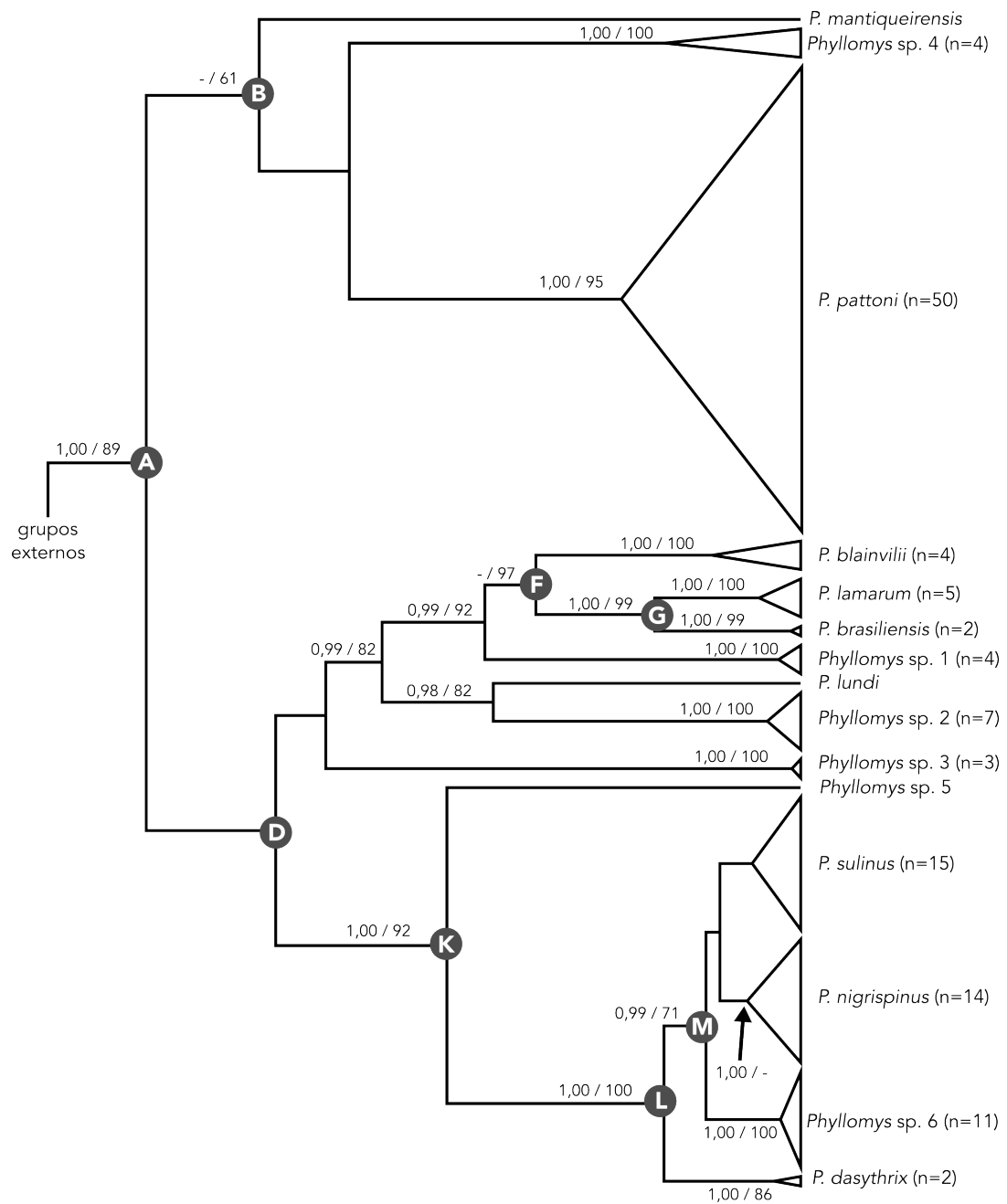


Figura V. Árvore de inferência bayesiana de espécies de *Phyllomys*, construída com sequências de COI. Letras dentro dos círculos cinza se referem aos nós identificados na Figura 1. Valores nos ramos indicam probabilidade posterior bayesiana (PPB) / *bootstrap* da máxima verossimilhança.

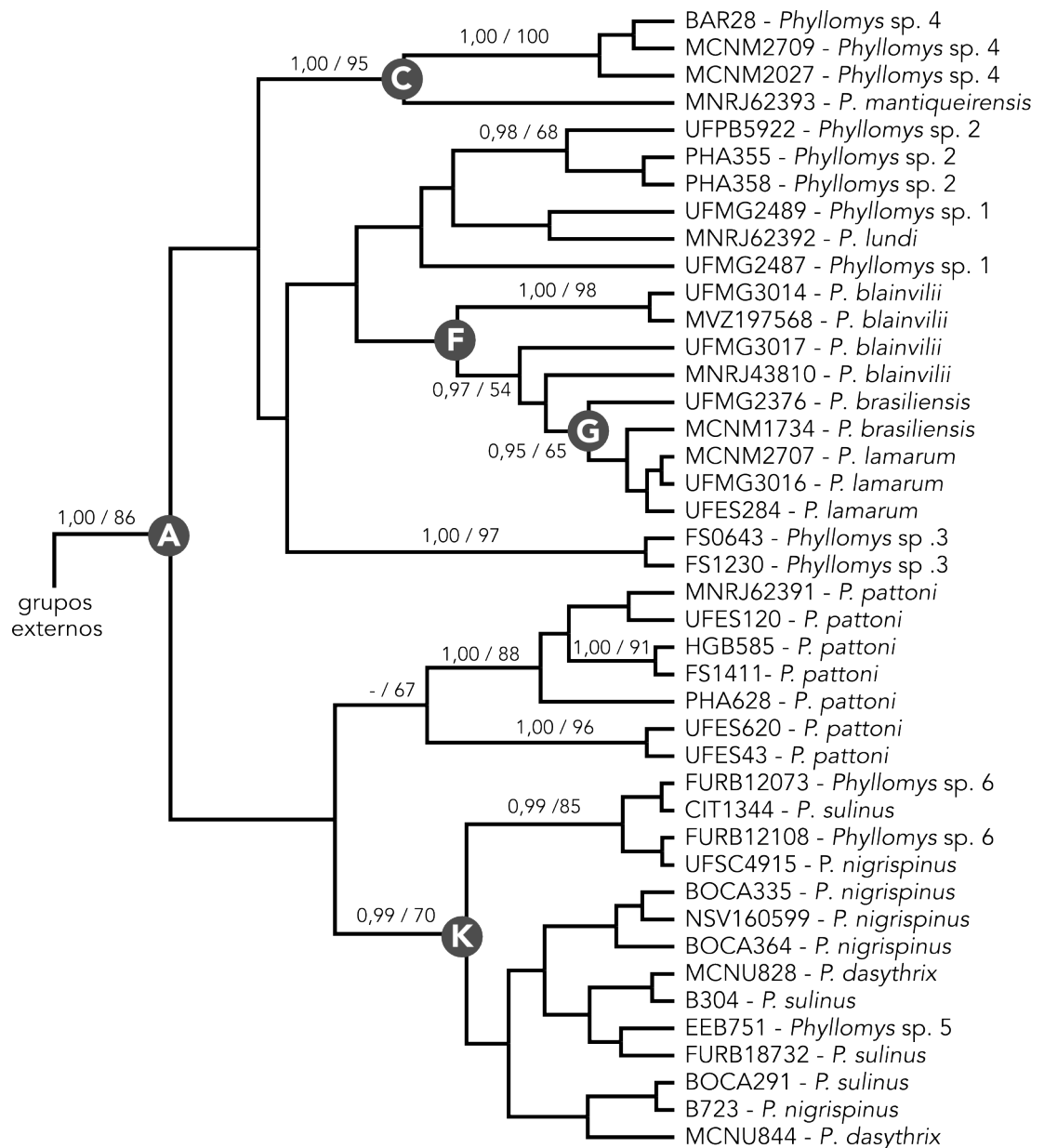


Figura VI. Árvore de inferência bayesiana de espécies de *Phyllomys*, construída com sequências de GHR. Letras dentro dos círculos cinza se referem aos nós identificados na Figura 1. Valores nos ramos indicam probabilidade posterior bayesiana (PPB) / bootstrap da máxima verossimilhança.

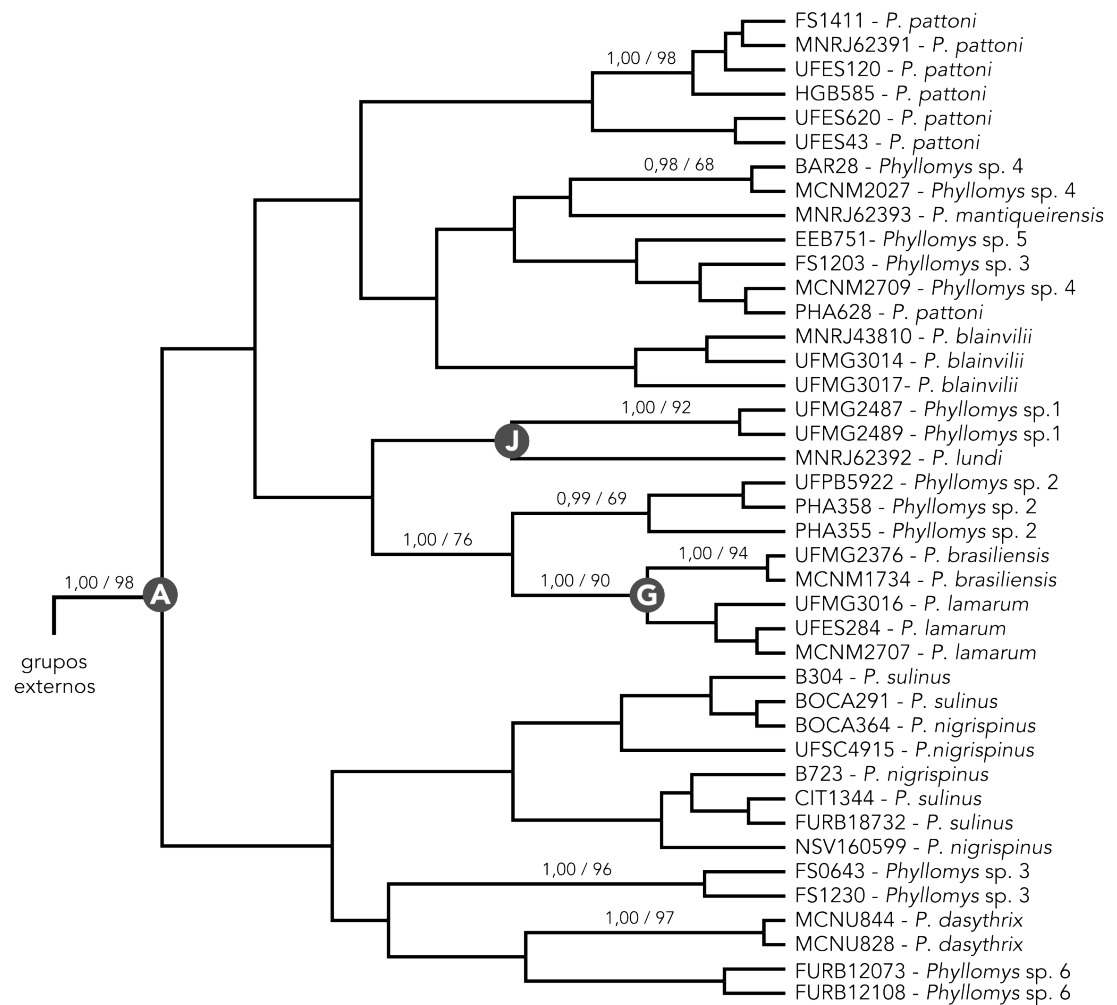


Figura VII. Árvore de inferência bayesiana de espécies de *Phyllomys*, construída com sequências de RAG1. Letras dentro dos círculos cinza se referem aos nós identificados na Figura 1. Valores nos ramos indicam probabilidade posterior bayesiana (PPB) / *bootstrap* da máxima verossimilhança.

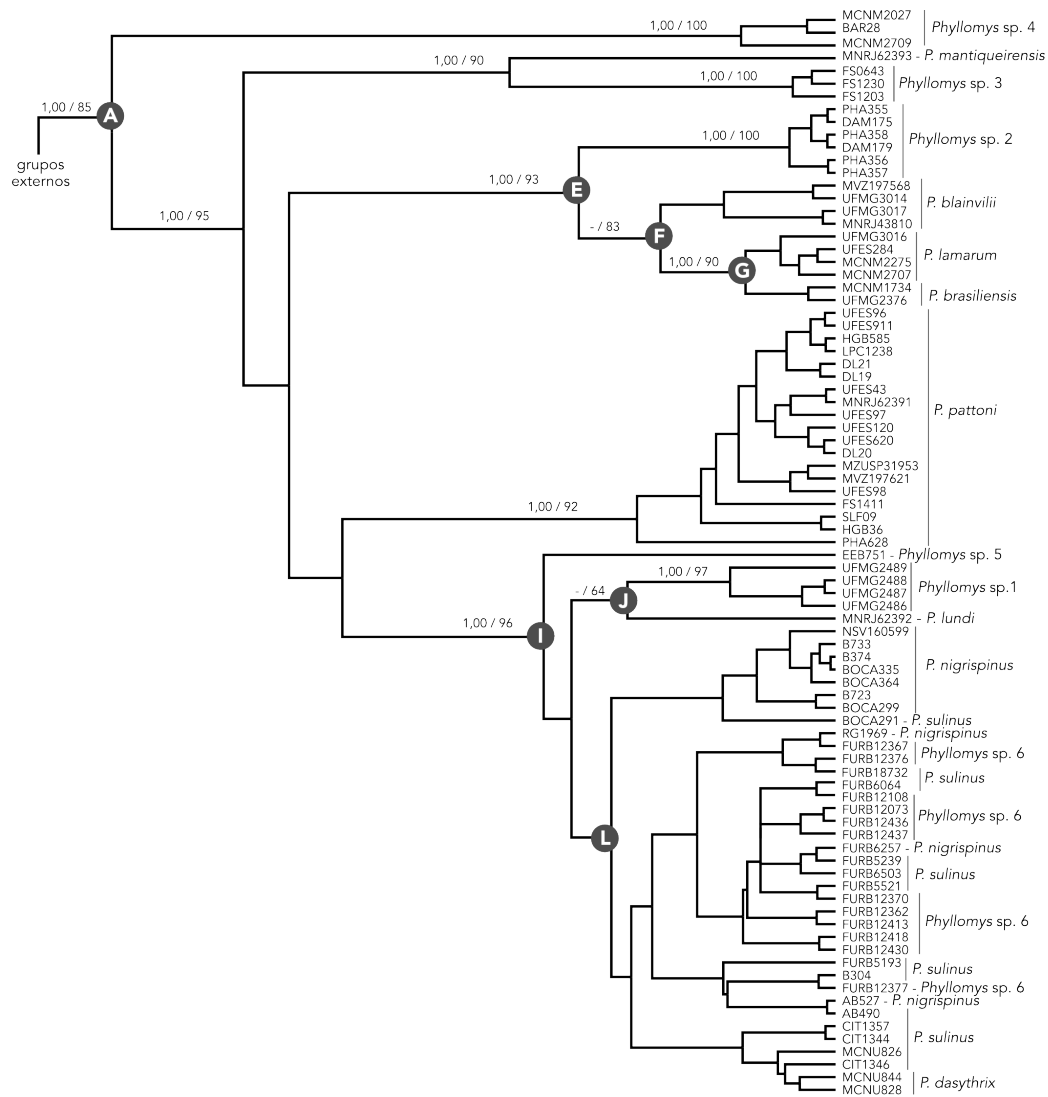


Figura VIII. Árvore de inferência bayesiana de espécies de *Phyllomys*, construída com sequências de vWF. Letras dentro dos círculos cinza se referem aos nós identificados na Figura 1. Valores nos ramos indicam probabilidade posterior bayesiana (PPB) / bootstrap da máxima verossimilhança.

Apêndice 6. Valores de suporte para as análises bayesiana (B) e de máxima verossimilhança (MV) de *Phyllomys* para cada marcador e para a análise com todos os marcadores. Os nós estão identificados de acordo com a Figura 1. “x” representa nó recuperado, porém sem suporte, enquanto “–” indica que o nó não foi recuperado. O texto lista as principais diferenças encontradas entre as análises com os diferentes marcadores e critérios de otimização.

nó	suporte											
	CitB		COI		GHR		RAG1		vWF		tudo	
	B	MV	B	MV	B	MV	B	MV	B	MV	B	MV
A	x	–	1,00	89	1,00	86	1,00	98	1,00	85	1,00	97
B	x	–	x	61	–	–	–	–	–	–	x	–
C	x	–	–	–	1,00	95	–	–	–	–	x	–
D	0,98	53	x	–	–	–	–	–	–	–	1,00	89
E	–	–	–	–	–	–	–	–	1,00	93	1,00	60
F	–	–	x	97	x	54	–	–	x	83	1,00	99
G	1,00	91	1,00	99	0,95	64	1,00	90	1,00	90	1,00	100
H	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	x	x
I	–	–	–	–	–	–	–	–	1,00	96	1,00	x
J	–	–	–	–	–	–	x	–	x	64	1,00	x
K	1,00	77	1,00	92	0,99	70	–	–	–	–	1,00	100
L	1,00	100	1,00	100	–	–	–	–	x	x	1,00	100
M	x	88	0,99	71	–	–	–	–	–	–	1,00	92
N	0,99	95	–	–	–	–	–	–	–	–	x	80

A topologia inferida com sequências de CitB de 143 UTO's recuperou os nós A, B, C, D, G, K, L, M e N, porém sem suporte estatístico bayesiano nem de *bootstrap* para A, B e C (Apêndice 5, Figuras II e III). As relações recuperadas com suporte estatístico por esse marcador, que não foram encontradas nas análises com todos os marcadores foram: um clado formado por ((*P. brasiliensis* + *P. lamarum*) + *P. blainvillii* + *Phyllomys* sp. 1), tanto nas análises bayesiana (PPB = 1,00) quanto de máxima verossimilhança (*bootstrap* = 92) e *P. blainvillii* irmão de *Phyllomys* sp. 1 apenas na máxima verossimilhança (*bootstrap* = 79).

A topologia inferida com sequências de COI de 127 UTO's recuperou os nós A, B, D, F, G, K, L e M, porém sem suporte estatístico bayesiano nem de *bootstrap* para B e C (Apêndice 5, Figura V). As relações recuperadas com suporte estatístico por esse marcador, tanto nas análises bayesianas quanto de máxima verossimilhança, que não foram encontradas nas análises com todos os marcadores juntos foram: um clado formado por (((*P. brasiliensis* + *P. lamarum*) *P.*

blainvili) *Phyllomys* sp. 1) (PPB = 0,99 e *bootstrap* = 92); *P. lundi* irmão de *Phyllomys* sp. 2 (PPB = 0,98 e *bootstrap* = 82); e um clado juntando esses dois anteriormente citados (((*P. brasiliensis* + *P. lamarum*) *P. blainvili*) *Phyllomys* sp. 1) + (*P. lundi* + *Phyllomys* sp. 2)) (PPB = 0,99 e *bootstrap* = 82).

A topologia inferida com sequências de GHR de 44 UTO's recuperou os nós A, C, F, G e K, porém sem suporte estatístico bayesiano nem de *bootstrap* para F (Apêndice 5, Figura VI). O alinhamento das sequências utilizado para a construção da filogenia apresenta (dados não mostrados) uma inserção de 6 bases nitrogenadas (GGC ACA), que correspondem a dois aminoácidos (Glicina e Treonina), em todos os indivíduos do clado K, em relação aos demais indivíduos. Nenhuma relação foi recuperada com suporte estatístico por esse marcador que não tivesse sido recuperada nas análises com todos os marcadores juntos, no entanto, esse foi o único marcador que recuperou com suporte o nó C (*Phyllomys* sp. 4 + *P. mantiqueirensis*) (PPB = 1,00 e *bootstrap* = 95).

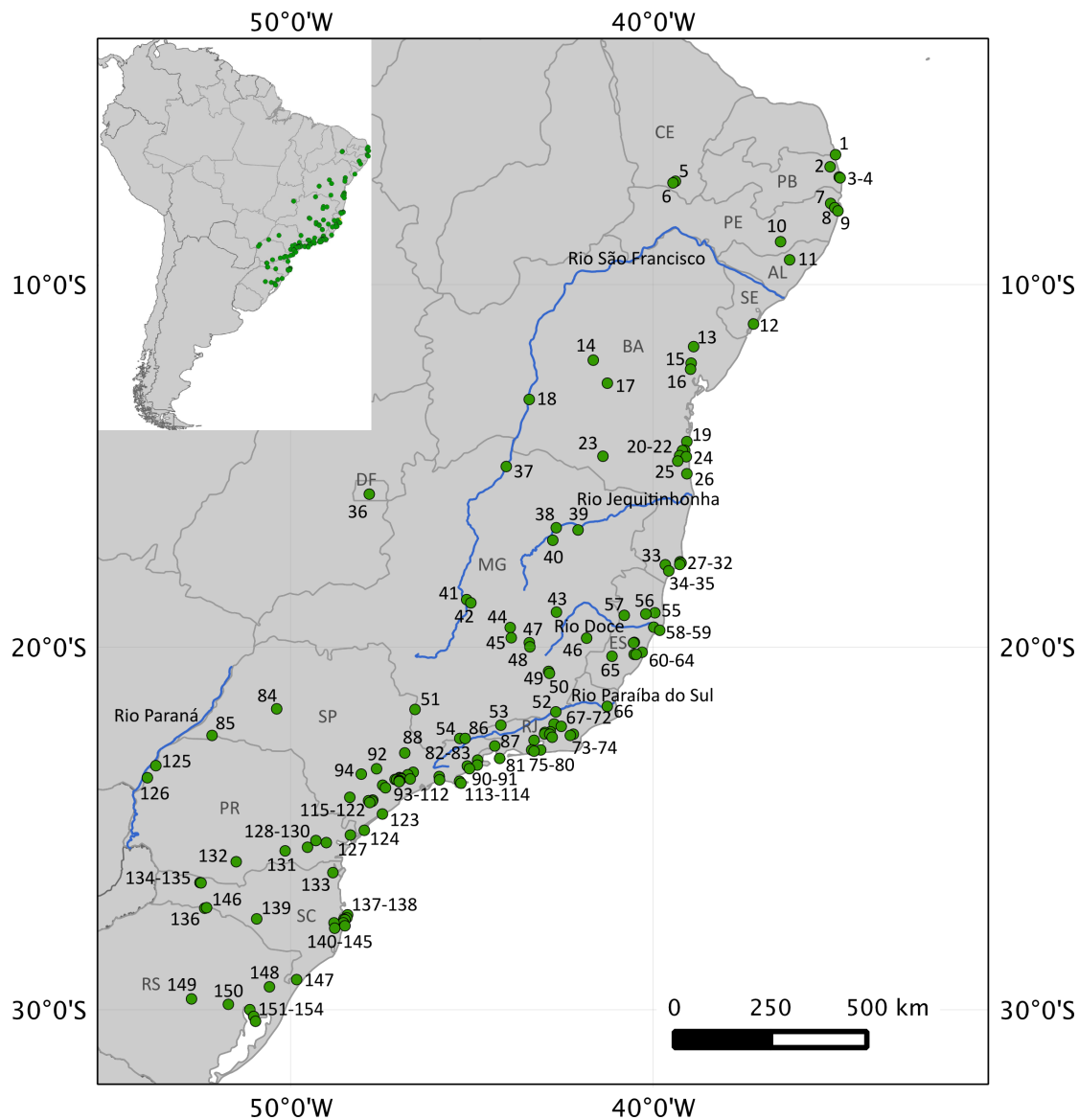
A topologia inferida com sequências de RAG1 de 44 UTO's recuperou apenas os nós A, J e G porém sem suporte estatístico bayesiano nem de *bootstrap* para J (Apêndice 5, Figura VII). A análise com esse marcador recuperou com suporte (PPB = 1,00 e *bootstrap* = 76) a relação entre (*Phyllomys* sp. 2 (*P. brasiliensis* + *P. lamarum*)), não encontrada nas análises com todos os marcadores juntos.

A topologia inferida com sequências de vWF de 127 UTO's recuperou os nós A, E, F, G, I, J e L, porém sem suporte estatístico bayesiano nem de *bootstrap* para J e L (Apêndice 5, Figura VIII). As relações recuperadas com suporte estatístico por esse marcador, tanto nas análises bayesianas quanto de máxima verossimilhança, que não foram encontradas nas análises com todos os marcadores juntos foram: *P. mantiqueirensis* irmão de *Phyllomys* sp. 3 (PPB = 1,00 e *bootstrap* = 90); e *Phyllomys* sp. 4, externo a todas as outras espécies de *Phyllomys* (PPB = 1,00 e *bootstrap* = 95).

Apêndice 7. Valores de suporte para a monofilia das espécies de *Phyllomys* nas análises bayesiana (B) e de máxima verossimilhança (MV) para marcadores mitocondriais CitB e COI e para todos os cinco marcadores juntos. As análises concatenadas de mtDNA (CitB e COI) e vWF foram realizadas apenas para as espécies do nó M, de acordo com a Figura 1. “x” representa nó recuperado, porém sem suporte, enquanto “–” indica que o nó não foi recuperado. “na¹” indica que o teste de monofilia não se aplica pois só há um indivíduo representando a espécie. “na²” indica que o teste da monofilia não se aplica pois a espécie não foi incluída na análise.

Espécie	suporte							
	CitB		COI		tudo		mtDNA+vWF	
	B	MV	B	MV	B	MV	B	MV
<i>Phyllomys</i> sp. 4	1,00	100	1,00	100	1,00	100	na ²	na ²
<i>P. pattoni</i>	1,00	93	1,00	95	1,00	100	na ²	na ²
<i>Phyllomys</i> sp. 2	1,00	100	1,00	100	1,00	100	na ²	na ²
<i>P. blainvillii</i>	1,00	100	1,00	100	1,00	100	na ²	na ²
<i>P. lamarum</i>	1,00	79	1,00	100	1,00	100	na ²	na ²
<i>P. brasiliensis</i>	1,00	100	1,00	99	1,00	100	na ²	na ²
<i>Phyllomys</i> sp. 3	1,00	100	1,00	100	1,00	100	na ²	na ²
<i>Phyllomys</i> sp. 1	1,00	100	1,00	100	1,00	100	na ²	na ²
<i>Phyllomys</i> sp. 5	1,00	99	na ¹	na ¹	na ¹	na ¹	na ²	na ²
<i>P. nigrispinus</i>	1,00	100	1,00	75	1,00	100	1,00	100
<i>P. sulinus</i>	1,00	89	x	–	x	x	1,00	98
<i>Phyllomys</i> sp. 6	1,00	99	1,00	100	1,00	100	1,00	100
<i>P. dasythrix</i>	1,00	98	1,00	86	1,00	100	na ²	na ²

Apêndice 8. Mapa com as localidades de *Phyllomys*. Tabela mostra o nome de cada localidade e as respectivas coordenadas geográficas. Siglas utilizadas para as Unidades Federais (UF) são: Alagoas (AL), Bahia (BA), Ceará (CE), Distrito Federal (DF), Espírito Santo (ES), Minas Gerais (MG), Paraná (PR), Paraíba (PB), Pernambuco (PE), Rio de Janeiro (RJ), Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC), Sergipe (SE) e São Paulo (SP).



ID	Localidade	UF	Longitude	Latitude
1	Floresta da Lyondel Chemical Company, Mataraca	PB	-34.9667	-6.5000
2	Camaratuba, Mamanguape	PB	-35.1167	-6.8333
3	João Pessoa, próximo ao NUPPA	PB	-34.8667	-7.1167
4	Campus I, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa	PB	-34.8397	-7.1392
5	Crato	CE	-39.3833	-7.2333
6	Chapada do Araripe, 7 km SW Crato	CE	-39.4508	-7.2775
7	CIMNC (Campo de Instrução Marechalk Newton Cavalcanti),	PE	-35.1019	-7.8439

	Paudalho			
8	Granja Maturi, Condomínio Chã de Peroba, km 6 da estrada de Aldeia, Aldeia, Camaragibe	PE	-34.9878	-7.9636
9	Dois Irmãos, Recife	PE	-34.9000	-8.0500
10	Sítio Cavaquinho, Garanhuns	PE	-36.4833	-8.9000
11	Sítio Angelim, Viçosa	AL	-36.2333	-9.4000
12	Fazenda Trapsa, Itaporanga D'Ajuda	SE	-37.2300	-11.1700
13	Lamarão, ca. 70 milhas NW Salvador	BA	-38.8817	-11.7936
14	Várzea da Canabrava, Seabra	BA	-41.6500	-12.1667
15	9 km SE Feira de Santana	BA	-38.9500	-12.2500
16	São Gonçalo, 30 km SW Feira de Santana	BA	-38.9667	-12.4167
17	Fazenda Santa Rita, 8 km E Andaraí	BA	-41.2614	-12.8017
18	Rio São Francisco, Bom Jesus da Lapa	BA	-43.4167	-13.2500
19	Parque Estadual Serra do Conduru (Ilhéus, Uruçuca e Itacaré)	BA	-39.0682	-14.4125
20	Aritaguá-Urucutuca, Ilhéus	BA	-39.1253	-14.6578
21	Fazenda Almada, Ilhéus	BA	-39.1903	-14.6600
22	Itabuna	BA	-39.2667	-14.8000
23	São Felipe	BA	-41.3833	-14.8167
24	Fazenda Pirataquicê, Ilhéus	BA	-39.0833	-14.8300
25	Mata Fortuna, Itabuna	BA	-39.3200	-14.9500
26	Una, Ilhéus	BA	-39.0667	-15.3000
27	Mangue do Caritoti, Caravelas	BA	-39.2597	-17.7250
28	Chácara do Lulu, Caravelas	BA	-39.2561	-17.7278
29	Fazenda Espada Ilha, Ilha da Cassumba, Caravelas	BA	-39.2550	-17.7533
30	Ilha Salina, Caravelas	BA	-39.2281	-17.7581
31	Fazenda Monte Castelo, Ilha da Cassumba, Caravelas	BA	-39.2639	-17.7944
32	Fazenda Monte Castelo, Ilha da Cassumba, 7 km SW Caravelas	BA	-39.2636	-17.8017
33	Helvécia, Nova Viçosa	BA	-39.6636	-17.8083
34	Fazenda Elma, Nova Viçosa	BA	-39.5647	-17.9756
35	Fazenda João Guarda, Nova Viçosa	BA	-39.5672	-17.9789
36	Fazenda Água Limpa, Córrego da Onça, Brasília	DF	-47.8290	-15.8622
37	Mocambinho, Jaíba	MG	-44.0500	-15.1000
38	UHE Irapé	MG	-42.6717	-16.7886
39	Araçuaí	MG	-42.0700	-16.8500
40	Estação Ecológica de Acauã, 17 km N Turmalina	MG	-42.7667	-17.1333
41	Fazenda Santa Cruz, Felixlândia	MG	-45.1428	-18.7706
42	UHE Retiro Baixo, Pompeu	MG	-45.0267	-18.8603
43	Usina Hidrelétrica de Braúnas, Braúnas	MG	-42.6653	-19.1153
44	Sumidouro, ca. 12 km NW Lagoa Santa	MG	-43.9411	-19.5411
45	Belo Horizonte	MG	-43.9128	-19.8222
46	Fazenda Montes Claros, Caratinga	MG	-41.8333	-19.8333
47	Santa Bárbara	MG	-43.4150	-19.9589
48	Catas Altas	MG	-43.3981	-20.0742
49	Silvicultura, Viçosa	MG	-42.8833	-20.7500
50	Mata Paraíso, Viçosa	MG	-42.8589	-20.8050
51	Alto da Consulta, Poços de Caldas	MG	-46.5667	-21.8000
52	Fazenda São Geraldo, Além Paraíba	MG	-42.6833	-21.8667

53	Fazenda do Bené, 4 km SE Passa Vinte	MG	-44.2000	-22.2333
54	Fazenda da Onça, 13 km SW Delfim Moreira	MG	-45.3333	-22.6000
55	Fazenda Santa Terezinha, 33 km NE Linhares	ES	-39.9500	-19.1333
56	Rio São José	ES	-40.2000	-19.1667
57	Pancas	ES	-40.7953	-19.2044
58	Fazenda Sapucaia, Bananal do Sul, Linhares	ES	-39.9816	-19.5313
59	Povoação, Linhares	ES	-39.8167	-19.6167
60	Parque Estadual da Fonte Grande, Vitória	ES	-40.3500	-20.3500
61	Estação Biológica de Santa Lúcia, Santa Teresa	ES	-40.5394	-19.9650
62	Manguezal de Vitória, próximo ao bairro Maria Ortiz, Vitória	ES	-40.3028	-20.2210
63	Reserva Biológica de Duas Bocas, Alto Alegre, Cariacica	ES	-40.5219	-20.2811
64	Reserva Biológica de Duas Bocas, Cariacica	ES	-40.4667	-20.2833
65	Hotel Fazenda Monte Verde, 24 km SE Venda Nova do Imigrante	ES	-41.1333	-20.3333
66	Campos dos Goytacazes	RJ	-41.2642	-21.7144
67	Fazenda São José da Serra, 6 km E e 9,2 km N Bonsucesso, Sumidouro	RJ	-42.7300	-22.2000
68	Nova Friburgo	RJ	-42.5333	-22.2667
69	Fazenda Alpina, Teresópolis	RJ	-42.8333	-22.4167
70	Fazenda Comari, Teresópolis	RJ	-42.9833	-22.4333
71	Garrafão	RJ	-42.9933	-22.4744
72	Fazenda Rosimery, Cachoeiras de Macacu	RJ	-42.8500	-22.4833
73	Fazenda União, Casimiro de Abreu	RJ	-42.2000	-22.4833
74	Reserva Biológica de Poço das Antas, Silva Jardim	RJ	-42.2833	-22.5167
75	FS6, Cachoeiras de Macacu	RJ	-42.8000	-22.5333
76	FS12, Cachoeiras de Macacu	RJ	-42.7833	-22.5667
77	Santa Cruz, estrada Rio-Petrópolis	RJ	-43.2833	-22.6500
78	Monte São Francisco, Jacarepaguá	RJ	-43.3500	-22.9167
79	Saco de São Francisco, Niterói	RJ	-43.1000	-22.9167
80	Tijuca, Trapicheiro	RJ	-43.2833	-22.9500
81	Caxadaço, Ilha Grande, Angra dos Reis	RJ	-44.2333	-23.1500
82	Parque Nacional da Serra da Bocaina - RJ-165, Paraty, área 1	RJ	-44.8372	-23.1897
83	Parque Nacional da Serra da Bocaina - RJ-165, Paraty, área 2	RJ	-44.8397	-23.1986
84	Vanuie	SP	-50.3833	-21.7833
85	Teodoro Sampaio	SP	-52.1667	-22.5167
86	Piquete	SP	-45.1833	-22.6000
87	Estação Ecológica de Bananal, Bananal	SP	-44.3678	-22.8067
88	Itatiba	SP	-46.8500	-23.0000
89	Núcleo Picinguaba, Trilha do Vietnã, Ubatuba	SP	-44.8500	-23.3333
90	Parque Estadual da Serra do Mar, Núcleo Santa Virgínia, 10 km NW Ubatuba	SP	-45.1250	-23.3583
91	Estação Experimental, Ubatuba	SP	-45.0667	-23.4333
92	Floresta Nacional de Ipanema, 20 km NW Sorocaba	SP	-47.6281	-23.4353
93	São Paulo	SP	-46.6167	-23.5333
94	Itapetininga	SP	-48.0500	-23.5833
95	Taboão da Serra	SP	-46.7667	-23.6000
96	Estação Biológica de Borçéia, Salesópolis	SP	-45.9000	-23.6500
97	Sítio Ruth, Reserva Florestal do Morro Grande, Cotia	SP	-46.9950	-23.6788

98	Localidade B, Reserva Florestal do Morro Grande, Cotia	SP	-46.9567	-23.6958
99	Sítio Psicótica, Reserva Florestal do Morro Grande, Cotia	SP	-46.9548	-23.6960
100	Sítio Caucaia, Reserva Florestal do Morro Grande, Cotia	SP	-46.9949	-23.6966
101	Localidade C, Reserva Florestal do Morro Grande, Cotia	SP	-46.9456	-23.7150
102	Interlagos	SP	-46.7000	-23.7167
103	Lacerda, Ibiúna	SP	-47.1178	-23.7303
104	Pedroso, Ibiúna	SP	-47.0744	-23.7358
105	Rio Guaratuba, Bertioga	SP	-45.8911	-23.7408
106	Sítio Caçador, Reserva Florestal do Morro Grande, Cotia	SP	-47.0014	-23.7438
107	Sítio Dilúvio, Reserva Florestal do Morro Grande, Cotia	SP	-46.9971	-23.7448
108	Sítio Pseudópode, Reserva Florestal do Morro Grande, Cotia	SP	-47.0027	-23.7471
109	Quilombo, Cotia	SP	-47.0047	-23.7558
110	Sítio Catedral, Reserva Florestal do Morro Grande, Cotia	SP	-46.9988	-23.7630
111	Sítio Maritaca, Reserva Florestal do Morro Grande, Cotia	SP	-47.0048	-23.7699
112	Sítio Palmito, Reserva Florestal do Morro Grande, Cotia	SP	-47.0011	-23.7711
113	Ilhabela, Ilha de São Sebastião	SP	-45.3400	-23.7833
114	Ilha de São Sebastião	SP	-45.3000	-23.8333
115	Sítio Pexe, Reserva Florestal do Morro Grande, Cotia	SP	-47.0063	-23.7907
116	Sítio Baleia, Piedade	SP	-47.4598	-23.8890
117	Sítio Jupará, Piedade	SP	-47.3826	-23.9604
118	Sítio Moacir, Ribeirão Grande	SP	-48.3666	-24.2235
119	Primeiro Morro	SP	-47.7333	-24.3000
120	Barra do Ribeirão Onça Parda	SP	-47.8500	-24.3167
121	Ribeirão Fundo	SP	-47.7500	-24.3333
122	Barra do Rio Juquiá	SP	-47.8167	-24.3667
123	Barra de Icapara	SP	-47.4667	-24.6833
124	Ilha do Cardoso, Cananéia	SP	-47.9667	-25.1333
125	Porto Camargo, Rio Paraná	PR	-53.7167	-23.3500
126	Rio Paracá	PR	-53.9500	-23.6833
127	Salto Morato, Guaraqueçaba	PR	-48.3500	-25.2633
128	Parque Barigüi, Bairro Mercês, Curitiba	PR	-49.3008	-25.4156
129	Roça Nova, Serra do Mar	PR	-49.0139	-25.4719
130	Guajuvira	PR	-49.5333	-25.6000
131	Palmira	PR	-50.1500	-25.7000
132	Represa de Foz do Areia, ca. 35 km S Pinhão	PR	-51.5000	-26.0000
133	Joinville	SC	-48.8333	-26.3000
134	Pequena Central Hidrelétrica Ludes, São Domingos	SC	-52.5004	-26.5757
135	Pequena Central Hidrelétrica Ludes, Ipuacú	SC	-52.4697	-26.5832
136	Usina Hidrelétrica de Itá, Itá	SC	-52.3691	-27.2815
137	Morro do Caçador, Vargem do Bom Jesus, Ilha de Santa Catarina	SC	-48.4264	-27.4633
138	Lagoa da Conceição, Freguesia, Florianópolis	SC	-48.4500	-27.5500
139	Foz do Rio Caveiras, Abdom Batista	SC	-50.9344	-27.5761
140	Florianópolis	SC	-48.5300	-27.5833
141	Ilha de Santa Catarina	SC	-48.5000	-27.6000
142	Fazenda Ressacada, UFSC, Ilha de Santa Catarina	SC	-48.5441	-27.6851
143	Caldas da Imperatriz	SC	-48.8014	-27.6856

144	Praia dos Açores próximo a Pântano do Sul, Ilha de Santa Catarina	SC	-48.5000	-27.7667
145	Serra do Tabuleiro	SC	-48.7833	-27.8333
146	Usina Hidrelétrica de Itá, Aratiba	RS	-52.3167	-27.2667
147	Parque Nacional dos Aparados da Serra, Cambará do Sul	RS	-49.8333	-29.2500
148	São Francisco de Paula	RS	-50.5833	-29.4500
149	Pinheiros, Candelária	RS	-52.7333	-29.7833
150	Banhado do Pontal, Triunfo	RS	-51.7167	-29.9333
151	Porto Alegre	RS	-51.1250	-30.0792
152	Bairro Agronomia, Porto Alegre	RS	-51.1247	-30.0792
153	Itapuã, Viamão	RS	-51.0167	-30.2667
154	Parque Estadual de Itapuã, Viamão	RS	-50.9667	-30.4000

Apêndice 9. Estimativa de tempo de divergência das linhagens de *Phyllomys*. Identificação dos nós de acordo com a Figura 1. IC 95 % representa o intervalo de confiança de 95 % das estimativas.

nó	data em milhões de anos		Época Geológica
	mediana	IC 95 %	
A	5,65	3,97–7,46	Plioceno-Mioceno
B	5,29	3,67–7,02	Plioceno-Mioceno
C	4,35	2,79–6,07	Plioceno-Mioceno
D	4,87	3,40–6,48	Plioceno-Mioceno
E	3,28	2,21–4,52	Pleistoceno-Plioceno
F	2,49	1,58–3,52	Pleistoceno-Plioceno
G	0,95	0,51–1,57	Pleistoceno
H	4,28	2,98–5,81	Plioceno
I	3,22	2,23–4,44	Pleistoceno-Plioceno
J	2,33	1,43–3,43	Pleistoceno-Plioceno
K	2,33	1,53–3,31	Pleistoceno-Plioceno
L	1,41	0,90–2,04	Pleistoceno
M	1,06	0,65–1,54	Pleistoceno
N	0,79	0,43–1,22	Pleistoceno
<i>Phyllomys/Echimys</i>	10,44	7,63–13,14	Mioceno

Apêndice 10. Tabela com distâncias genéticas p não corrigida (%) intra e interespecíficas de *Phyllomys* calculadas a partir de sequências de CitB. Diagonal em negrito representam divergências intraespecíficas. Para àquelas espécies representadas por só um indivíduo, o cálculo da distância intraespecífica não se aplica (na). Abaixo da diagonal estão os valores de distância interespecífica e acima o respectivo erro padrão.

	<i>P. blainvillii</i>	<i>P. brasiliensis</i>	<i>P. dasythrix</i>	<i>P. lamarum</i>	<i>P. lundii</i>	<i>P. mantiqueirensis</i>	<i>P. nigrispinus</i>	<i>P. pattoni</i>	<i>P. sulinus</i>	<i>Phyllomys</i> sp. 1	<i>Phyllomys</i> sp. 2	<i>Phyllomys</i> sp. 3	<i>Phyllomys</i> sp. 4	<i>Phyllomys</i> sp. 5	<i>Phyllomys</i> sp. 6	<i>Echimy</i>	<i>Makalata</i>
<i>P. blainvillii</i>	1.1	1.3	1.3	1.1	1.6	1.4	1.4	1.6	1.4	1.1	1.6	1.6	1.6	1.5	1.5	2.0	2.0
<i>P. brasiliensis</i>	7.2	0.0	1.4	0.9	1.5	1.5	1.5	1.4	1.5	1.2	1.5	1.5	1.5	1.5	1.6	1.8	2.0
<i>P. dasythrix</i>	8.4	9.2	0.0	1.3	1.6	1.6	0.6	1.4	0.7	1.3	1.4	1.4	1.6	1.3	0.7	2.0	1.9
<i>P. lamarum</i>	5.8	3.0	8.5	0.5	1.5	1.5	1.4	1.5	1.4	1.0	1.3	1.5	1.5	1.3	1.4	1.8	1.9
<i>P. lundii</i>	10.4	8.9	9.5	9.0	na	1.6	1.5	1.6	1.6	1.5	1.6	1.5	1.6	1.8	1.6	2.0	2.0
<i>P. mantiqueirensis</i>	8.2	8.9	9.2	8.8	11.5	na	1.6	1.3	1.6	1.5	1.5	1.7	1.6	1.7	1.6	1.9	2.0
<i>P. nigrispinus</i>	9.1	10.6	1.5	9.4	9.7	10.0	0.6	1.5	0.7	1.3	1.4	1.5	1.7	1.3	0.8	2.0	1.9
<i>P. pattoni</i>	10.7	9.0	8.9	9.2	11.0	7.5	9.8	1.5	1.5	1.5	1.5	1.6	1.5	1.5	1.5	1.8	1.9
<i>P. sulinus</i>	9.6	10.9	2.0	9.6	10.9	10.1	2.4	10.4	0.4	1.3	1.5	1.5	1.7	1.4	0.7	2.0	1.9
<i>Phyllomys</i> sp. 1	5.1	5.8	7.6	4.2	9.3	9.6	8.5	9.7	8.8	0.2	1.4	1.4	1.6	1.5	1.4	1.9	1.9
<i>Phyllomys</i> sp. 2	10.3	8.6	8.3	6.7	10.6	8.2	8.8	9.3	9.7	7.9	0.5	1.4	1.4	1.5	1.4	2.0	1.9
<i>Phyllomys</i> sp. 3	9.9	8.4	8.8	8.0	9.4	10.7	9.5	10.8	10.0	8.9	7.8	0.2	1.5	1.7	1.5	2.0	1.9
<i>Phyllomys</i> sp. 4	11.2	10.5	11.0	9.9	12.3	10.7	12.0	9.2	12.4	10.8	9.6	10.0	2.6	1.6	1.7	1.8	1.9
<i>Phyllomys</i> sp. 5	10.2	9.3	7.9	7.5	12.3	11.6	8.4	10.2	8.7	9.5	9.0	11.5	12.5	0.6	1.4	2.0	1.9
<i>Phyllomys</i> sp. 6	9.7	11.1	2.2	9.8	10.8	10.0	2.5	9.7	1.9	9.0	9.3	10.2	12.6	8.1	0.1	2.0	1.9
<i>Echimy</i>	15.0	13.0	15.1	13.3	16.9	13.0	16.0	13.2	16.5	13.5	14.8	15.2	14.7	14.3	16.5	na	2.1
<i>Makalata</i>	16.8	15.4	15.7	14.8	16.6	17.5	16.4	15.7	16.9	15.3	15.9	15.9	15.6	17.1	16.8	17.8	na

CAPÍTULO 3

Distribuição geográfica e variação genética de *Euryzygomatomys*
spinosus (Rodentia: Echimyidae)

Resumo

Euryzgomatomys spinosus é um roedor Echimyidae com hábito semi-fossorial. Tem ocorrência registrada na Mata Atlântica, mas dados sobre distribuição geográfica são escassos. São pouco coletados e pouco representados em coleções científicas. A taxonomia atual reconhece *E. spinosus* como a única espécie do gênero, no entanto, nenhum estudo de revisão taxonômica ou variação genética foi feito pra confirmar essa classificação, visto que outras duas espécies ou subespécies já foram sugeridas para o grupo. O objetivo do presente trabalho foi utilizar dados da literatura, registros de museu e modelagem de nicho ecológico para avaliar a distribuição geográfica atual e histórica da espécie e caracterizar a variação genética ao longo dessa distribuição e suas implicações sistemáticas. Os resultados mostraram que *E. spinosus* apresenta distribuição em áreas de Mata Atlântica e adjacências ao sul do Rio Doce no Brasil, Paraguai e Argentina, incluindo um registro confirmado no Cerrado. Sua distribuição passada pode ter sido mais extensa, atingindo áreas a cerca de mil quilômetros ao norte da observada atualmente. A espécie ocupa habitats muito diversos e pode ser considerada generalista. As populações de *E. spinosus* são geneticamente estruturadas ao longo da sua distribuição, com evidências de isolamento por distância. A divergência genética mitocondrial encontrada é relativamente baixa, sugerindo uma estruturação recente, estimada para o final do Pleistoceno há cerca de 140 mil anos atrás. A população está subdivida em dois grupos, um mais ao norte da distribuição e outro mais ao sul, a partir da região centro-leste do estado de São Paulo. Resultados genéticos corroboram a taxonomia atual que considera apenas uma espécie no gênero: *E. spinosus*.

Palavras-chave: DNA mitocondrial; filogeografia; Mata Atlântica; modelagem de nicho ecológico; taxonomia.

1. Introdução

Euryzygomatomys spinosus (G. Fischer, 1814) é um roedor semi-fossorial de pequeno porte da família Echimyidae e a única espécie vivente reconhecida atualmente no seu gênero. Ocorre ao longo da porção sul da Mata Atlântica, ao sul do Rio Doce, incluindo áreas desse bioma na Argentina e Paraguai (Bonvicino et al., 1997; Eisenberg & Redford, 2000; Chu et al., 2003; Pinto et al., 2009; Cirignoli et al., 2011), mas pode ser registrado também nos Campos Sulinos (Bonvicino et al., 2002). Alguns autores indicaram sua ocorrência no Brasil Central (Lacher & Alho, 2001; Santos-Filho et al., 2012), no entanto esses registros foram baseados em espécimes de *Carterodon* erroneamente identificados como *Euryzygomatomys* (Bezerra et al., 2011). *Euryzygomatomys spinosus* é caracterizado por um corpo fusiforme coberto por pelagem rígida marrom e preta, orelhas e rabo curtos (Eisenberg & Redford, 2000; Bonvicino et al., 2008), crânio robusto com arco zigomático largo e bula auditiva inflada. O cariótipo foi descrito com $2n = 46$ com base em exemplares do estado de São Paulo (Yonenaga, 1975; Vilela et al., 2009). Seu grupo irmão é o gênero *Clyomys*, também de hábito semi-fossorial, com ocorrência em áreas do Cerrado e Pantanal (Galewski et al., 2005; Bonvicino et al., 2008).

Registros de *E. spinosus* em inventários de pequenos mamíferos são raros e geralmente com base em um pequeno número de indivíduos (e.g. Bonvicino et al., 1997; Geise et al., 2004; Scheibler & Christoff, 2007; Pinto et al., 2009; Abreu-Júnior, 2013), o que resulta em poucas localidades de ocorrência confirmadas com espécimes-testemunho. Como consequência, os limites de distribuição da espécie são imprecisos e existem muitos hiatos de localidades. Os mapas de distribuição da espécie disponíveis na literatura não apresentam localidades específicas de ocorrência, indicando apenas uma área aproximada (vide Bonvicino et al., 2008; Catzeflis et al., 2008). A carência de informações sobre

distribuição refletem também no pouco que se sabe sobre essa espécie em termos de comportamento, ecologia, morfologia e genética de uma forma geral.

Euryzygomatomys spinosus foi descrita com base no "rat épineux" de Azara (ou "el spinoso" da versão em espanhol). Apesar de atualmente ser a única espécie reconhecida no gênero, com localidade tipo em Atyrá, Paraguai, existem dois outros nomes considerados sinônimos-júnior de *E. spinosus*: *Euryzygomatomys guiara* (Brandt, 1835), com localidade-tipo em Ipanema, São Paulo e *Euryzygomatomys catellus* Thomas, 1916, com localidade-tipo em Joinville, Santa Catarina. Ellerman (1940) reconheceu *E. guiara* e *E. spinosus* como espécies distintas, sendo que o último com duas subespécies: *E. s. spinosus* e *E. s. catellus*. Moojen (1952) também tratou *E. spinosus* e *E. guiara* como espécies distintas, mas não mencionou subespécies, nem citou *E. catellus*. Já Cabrera (1961) reconheceu cada um dos três nomes disponíveis como subespécies de *E. spinosus*, listando os táxons *E. s. spinosus*, *E. s. guiara* e *E. s. catellus*. As compilações de espécies mais recentes reconhecem apenas *E. spinosus* (Bonvicino et al., 2008; Paglia et al., 2012) sem mencionar subespécies, mesmo sem nenhuma revisão taxonômica do grupo ou estudo de variação genética que corrobore tal classificação.

Levando em conta a carência de informações disponíveis na literatura sobre *E. spinosus* de uma forma geral, os objetivos do presente trabalhos foram: (1) avaliar a distribuição geográfica da espécie e inferir modelos de adequabilidade ambiental para sua distribuição; (2) caracterizar a variação genética ao longo da sua distribuição geográfica e as implicações sistemáticas dos resultados encontrados.

2. Material e Métodos

2.1. Localidades de ocorrência

261 registros de ocorrência de *Euryzygomatomys* foram obtidos de trabalhos publicados, registros de museus e dos bancos de dados *SpeciesLink* (<http://splink.cria.org.br/>) e *Global Biodiversity Information Facility* (GBIF – <http://www.gbif.org>). *Euryzygomatomys* é o único Echimyidae semi-fossorial de regiões de Mata Atlântica e pode ser considerado de fácil identificação nessas áreas, portanto os registros de regiões de Mata Atlântica foram considerados corretos. No entanto, ele pode ser confundido com *Clyomys* ou *Carterodon* em áreas de transição do Cerrado, principalmente nos estados de Minas e Gerais e São Paulo. A identidade taxonômica de registros nessas regiões foi confirmada por análise do material testemunho ou comunicação com os coletores. Os registros para os quais não foi possível confirmar a identificação foram excluídos, assim como aqueles sem localidade ou com localidade incerta. Todos os pontos sem coordenadas geográficas associadas foram georreferenciados no *Google Earth* (Google), de acordo com a localidade específica (quando disponível) ou município de ocorrência. Após a exclusão dos registros duvidosos, foram obtidos 76 pontos de ocorrência georreferenciados (Apêndice 1).

A fim de se verificar a adequabilidade ambiental para *E. spinosus* no presente e no passado, foi realizada uma análise de modelagem de nicho ecológico com base em todos os 76 pontos georreferenciados de ocorrência confirmada da espécie. Os valores das variáveis para cada ponto foram extraídos a partir das camadas ambientais do presente ("BIO") com resolução de 2,5 minutos, disponibilizadas pelo WordClim (<http://www.worldclim.org>), acessadas em novembro de 2013. As camadas mais informativas para explicar a distribuição da espécie foram pré-selecionadas por análise de componentes principais, seguida de teste de Mantel: BIO 2–4, 6, 11–13, 15, 18 e 19 (Apêndice 3). As análises de modelagem de nicho ecológico foram conduzidas utilizando o

algoritmo de máxima entropia implementado no programa Maxent 3.3.3 (Phillips et al., 2006). Os valores das variáveis selecionadas foram extraídos das camadas ambientais do presente e projetados nas camadas do presente, último máximo glacial (21 mil anos atrás) e último interglacial (120 mil anos atrás). Para a avaliação dos modelos gerados, foram observados os valores da área sob a curva (AUC) calculados pelo Maxent com 10 replicações de *bootstrap*.

2.2. Espécimes e sequências de DNA

Para as análises moleculares foram utilizadas amostras de fígado e músculo fixadas em etanol ou da pele de espécimes de museu. Foram sequenciados genes de 31 indivíduos de *E. spinosus*, provenientes de 17 localidades ao longo da distribuição geográfica (Apêndice 1). O material genético dos tecidos fixados em etanol foi isolado utilizando o protocolo de extração de DNA total com sal (SDS/NaCl/Proteinase K) descrito por Bruford et al. (1992) e o material retirado das peles foi isolado utilizando-se o kit de extração DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) de acordo com o protocolo descrito por Bi et al. (2013), com pequenas modificações (ver Capítulo 2 para as modificações).

Foram sequenciados fragmentos dos marcadores mitocondriais do gene citocromo b (CitB) e da região controle (*D-loop*). Cada reação em cadeia de polimerase (PCR) foi feita com volume final de 25 µL, sendo 2,5 µL de tampão 10×, 1,0 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,5 µL de solução de dNTP (10 mM cada nucleotídeo), 0,3 µL de cada primer (10 µM), 3 unidades de Taq Platinum (Invitrogen Corporation) e 1 µL de DNA. As PCR's para amplificação dos primeiros 801 pares de base (pb) do CitB do material extraído de tecido fixado em etanol foram realizadas utilizando os *primers* MVZ05 e MVZ16 (Smith & Patton, 1993). Para o material extraído de pele (três amostras: AF177, MCNM2265 e MLP16VII0211), foram sequenciados os primeiros 417 pb do CitB com os *primers* MVZ05 e MVZ04 (Smith & Patton, 1993). O perfil utilizado na PCR incluiu uma desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido por 39 ciclos e

uma extensão final a 72 °C por 7 minutos. Cada ciclo começou com uma desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 48 °C por 45 segundos e extensão a 72 °C por 45 segundos. Para amplificação de 396 pb do *D-loop*, foram utilizados os *primers* L0 e E3 (Douzery & Randi, 1993) com o seguinte perfil de PCR: desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos e uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. Cada ciclo começou com uma desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 52 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos. O produto amplificado foi purificado com as enzimas ExoSAP (GE Healthcare Life Sciences) e a reação de sequenciamento foi realizada com kit Big Dye v3.1 (Applied Biosystems) seguindo protocolo do fabricante. Utilizando sequenciador automático ABI 3500, as amostras foram sequenciadas nas duas direções, com os mesmos iniciadores utilizados na PCR.

2.3. Alinhamento e análises dos dados moleculares

As sequências geradas foram alinhadas no Geneious 5.6 (Biomatters). Os cálculos dos valores de diversidade haplotípica (H_d) e diversidade nucleotídica (π) foram feitos no programa DNAsp 5.1 (Librado & Rozas, 2009) e as redes de haplótipos foram construídas por *median-joining* (Bandelt et al., 1999) no programa Network (<http://www.fluxus-engineering.com>) e editadas no programa Inkscape (<http://www.inkscape.org>). Para a construção das redes de haplótipos foram utilizados dois conjuntos de dados separadamente: 417 pb de *CitB* de 31 unidades taxonômicas operacionais (UTO's) e 396 pb de *D-loop* de 28 UTO's.

Os cálculos de distância genética, teste de Mantel, análise de coalescência, análise de variância molecular (AMOVA) e análise espacial da variância molecular (SAMOVA) foram feitos para 801 pb de *CitB* com 31 UTO's e 396 pb de *D-loop* com 28 UTO's. A distância genética p não corrigida foi calculada no MEGA 6 (Tamura et al., 2013). Para verificar a existência de isolamento por distância, foi realizado teste de Mantel na plataforma R 3.0.1 (<http://www.R-project.org/>) com o pacote ade4 (Dray & Dufour, 2007), utilizando

correlação de Pearson e 500 replicações, sendo considerados significativos testes com $p \leq 0,05$. As análises de coalescência foram realizada no BEAST 1.7.5 (Drummond et al., 2012), utilizando *prior* de coalescência, tamanho populacional constante e modelos de evolução HKY (Hasegawa-Kishino-Yano) + G (gama) para ambos os conjuntos de dados, calculados no jModelTest 2.1.6 (Darriba et al., 2012) com o critério de informação bayesiano (BIC).

Para verificar a ocorrência de estruturação populacional ao longo da distribuição de *E. spinosus*, foram testados diferentes cenários no programa SAMOVA (Dupanloup et al., 2002) para cada marcador separadamente, permitindo o agrupamento das localidades em 2 a 10 populações (k). Os valores de variância entre os grupos de localidades (F_{CT}) encontrados na SAMOVA foram comparados ao valor de F_{ST} (variância entre todas as localidades) encontrado na AMOVA, realizada no programa Arlequin 3 (Excoffier et al., 2005) considerando todas as localidades como uma população.

Para a escolha do cenário mais adequado de estruturação de acordo com as análises de AMOVA e SAMOVA, primeiro foi avaliado o valor de F_{ST} , quando considerada apenas uma população incluindo toda as localidades. Se o F_{ST} for maior que 0,25 a variância é considerada muito elevada (Wright, 1978), sendo portanto um indicativo que aquelas localidades devem estar estruturadas em mais de uma população. O próximo passo foi verificar os valores de F_{CT} , que medem a variância entre os grupos de populações construídos na SAMOVA. O cenário mais adequado é aquele que maximiza a variância entre os grupos de populações (maior F_{CT}), no entanto, foram descartados aqueles onde há grupos formados por apenas uma localidade. Como os dois marcadores moleculares analisados (CitB e *D-loop*) estão ligados no genoma mitocondrial e segregam juntos, espera-se que ambos revelem uma estruturação semelhante, mesmo que as localidades amostradas não sejam exatamente as mesmas. Por isso, a escolha da estrutura levou em conta ainda a concordância entre os grupos de localidades indicados na SAMOVA para os dois marcadores separadamente.

Para o cálculo da taxa de evolução do CitB, foi construída uma matriz com 21 sequências de CitB de Echimyidae e grupos externos, sendo um representante de cada gênero amostrado (Apêndice 2). A datação foi feita no programa BEAST 2.1.3 com modelo de evolução GTR (general time reversible) + G, calculado no jModelTest 2.1.6, relógio relaxado com distribuição Lognormal (*relaxed clock Log Normal*) e *prior* do modelo de Yule para construção da árvore. A topologia foi indicada forçando a monofilia em vários pontos da filogenia, de acordo com informações disponíveis na literatura (Apêndice 2) (Upham & Patterson, 2012; Fabre et al., 2013; Upham et al., 2013; Loss et al., 2014). O relógio foi calibrado utilizando-se três registros fósseis importantes para a reconstrução da evolução dos Caviomorpha na América do Sul, seguindo Upham et al. (2013). Os valores mínimos da datação do fóssil foram utilizados como limites inferiores da estimativa (*offset*), assegurando que as estimativas de datações das linhagens sejam mais antigas que a datação do fóssil correspondente. Para todos os pontos de calibração do relógio foram utilizados *priors* com distribuição Lognormal, média 0 e desvio padrão 1.

O primeiro ponto de calibração utilizado foi o ancestral comum mais recente (ACMR) entre Chinchilloidea e Octodontoidea, representado pelo Octodontidae mais antigo, *Draconomys verai* (Vucetich et al., 2010; Antoine et al., 2012), da Formação Sarmiento do Oligoceno inferior, em Gran Barranca (Argentina), estimada entre 29,5 e 31,1 milhões de anos (Ma) atrás. O nó foi calibrado com a idade mínima de 29,5 Ma e intervalo de confiança (IC) de 95 % = 29,5–34,7 Ma. O segundo ponto de calibração foi o ACMR entre Octodontidae e Ctenomyidae, representado por um ramo ancestral ("*stem taxa*") da linhagem de *Ctenomys*, o *Xenodontomys simpsoni* (Verzi, 2008; Verzi et al., 2013) da Formação Los Salitres do Mioceno tardio, em Laguna Chasicó (Argentina), estimada entre 5,7 e 6,0 Ma (Verzi, 1999, 2008). O nó foi calibrado com a idade mínima de 5,7 Ma (IC 95 % = 5,7–10,9 Ma). O terceiro ponto de calibração foi o ACMR do clado *Thrichomys-Myocastor-Callistomys-Proechimys* (Loss et al., 2014),

representado por um ramo ancestral da linhagem de *Thrichomys*, o *Pampamys emmonsae* (Verzi et al., 1995, 2013; Olivares & Verzi, 2014), da Formação Cerro Azul do Mioceno tardio, em Laguna Chillhué (Argentina), estimada entre 6,0 e 9,3 Ma (Verzi et al., 2008). O nó foi calibrado com a idade mínima de 6,0 Ma (IC 95 % = 6,0–11,2 Ma).

A taxa de evolução encontrada para o CitB de *Euryzygomatomys* foi aplicada nas análises de coalescência do mesmo marcador, com relógio molecular estrito, a fim de se estimar a idade do ancestral comum mais recente (t_{ACMR}) das sequências analisadas.

3. Resultados

3.1. Distribuição geográfica de *Euryzygomatomys spinosus*

Dos 76 pontos de ocorrência de *E. spinosus* (Figura 1), 54 estão associados a espécimes de museu e/ou sequências de DNA que permitiram confirmação da identificação da espécie, os demais foram considerados corretos de acordo com a distribuição em áreas de Mata Atlântica onde não há ocorrência de outros Echimyidae semi-fossoriais. Foram registradas ocorrências em todos os estados do sudeste e sul do Brasil, além da Argentina e Paraguai, nas regiões de Mata Atlântica e adjacências, inclusive um registro confirmado no Cerrado (Loss et al., submetido).

Todos os modelos de adequabilidade ambiental apresentaram valores de AUC elevados ($> 0,97$), no entanto, a adequabilidade máxima foi baixa tanto para o presente (0,47) quanto para 120 mil anos atrás (0,46) e elevada para 21 mil anos atrás (0,81). As variáveis ambientais que mais influenciaram os modelos foram isothermalidade (BIO3) e temperatura média do trimestre mais frio (BIO11). O modelo para 21 mil anos atrás mostra uma adequabilidade maior em regiões bem mais ao norte da distribuição atual do gênero, abrangendo uma grande área

onde não há registro de ocorrência atual da espécie (Figura 2). As regiões de adequabilidade no modelo de 120 mil anos atrás, por outro lado, são similares às do presente, exceto por uma área de maior adequabilidade na porção nordeste do litoral brasileiro (Figura 2).

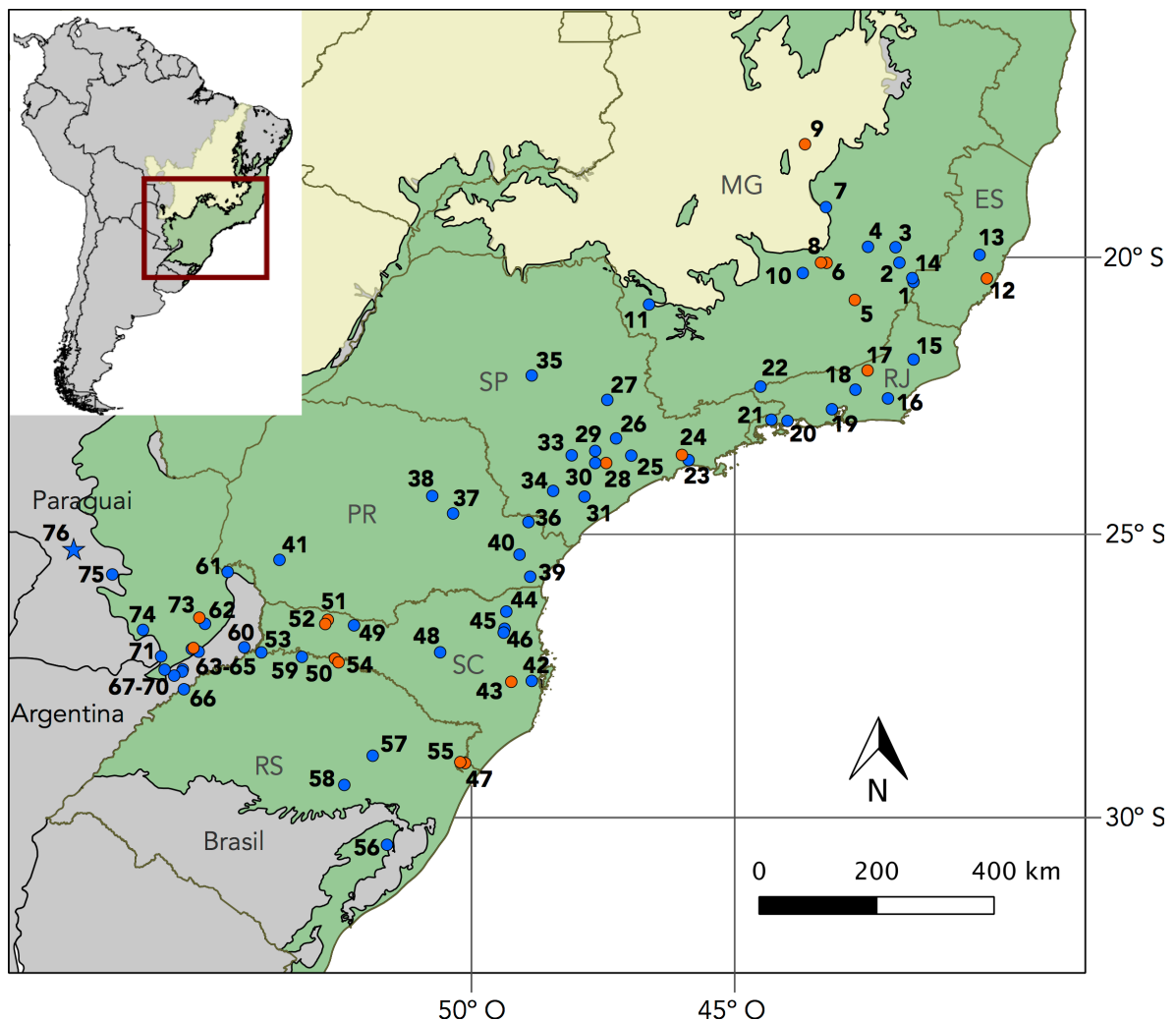


Figura 1. Distribuição geográfica de *Euryzgomatomys spinosus*. Estrela representa localidade tipo e pontos marcados em laranja representam localidades amostradas nas análises genéticas. As siglas dos estados e os pontos de ocorrência estão de acordo com as localidades listadas no Apêndice 1.

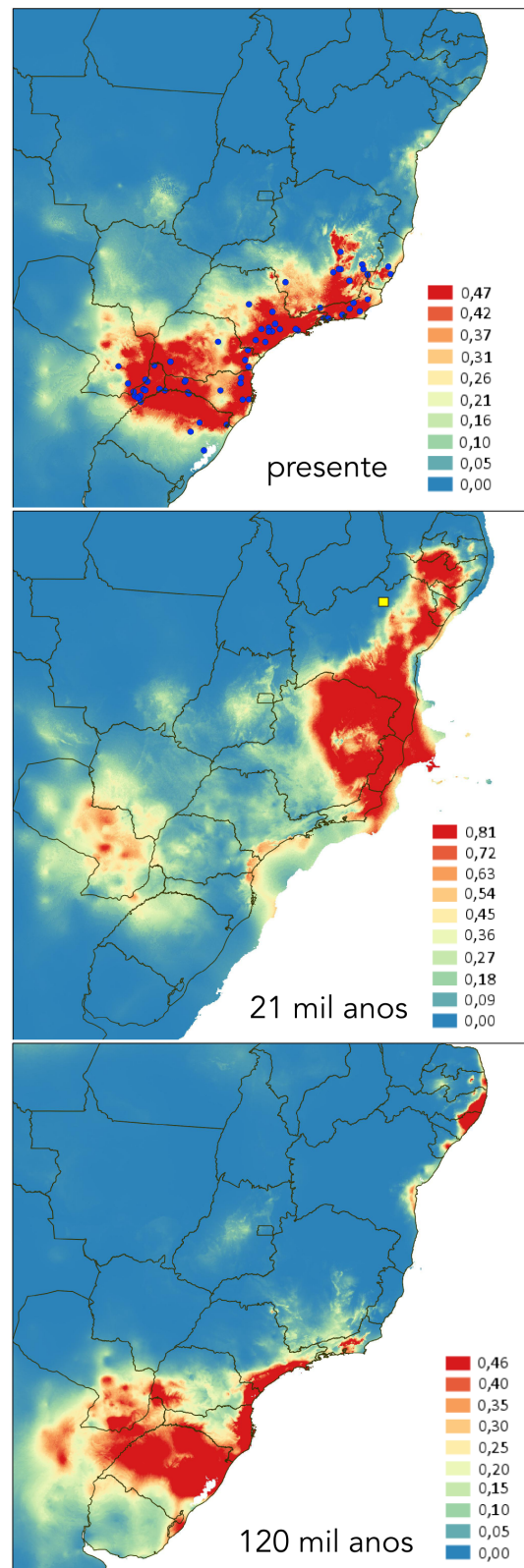


Figura 2. Modelos de adequabilidade ambiental no presente, há 21 mil anos atrás e há 120 mil anos atrás para *Euryzygomatomys spinosus* mostrando área média da distribuição estimada com base em 10 replicações para cada período. Cores mais quentes representam maior adequabilidade. Pontos no presente indicam localidades utilizadas para a modelagem. Quadrado amarelo no mapa de 21 mil anos indica fóssil coletado em Campo Formoso, Bahia.

3.2. Variação genética e relação entre haplótipos

Os valores de diversidade haplotípica e nucleotídica encontrados, tanto para o CitB quanto para o *D-loop*, foram elevados, enquanto as distâncias genéticas foram baixas (Tabela 1). Dentre os 31 indivíduos amostrados para o CitB, foram identificados 17 haplótipos e dentre os 28 indivíduos do *D-loop*, 19 haplótipos distintos. Foi encontrada correlação significativa entre as distâncias geográficas e genéticas, sugerindo isolamento por distância, tanto para as sequências de CitB ($r^2 = 0,65$; $p < 0,01$), quanto de *D-loop* ($r^2 = 0,75$; $p < 0,001$) (Tabela 1).

Tabela 1. Diversidades haplotípica (Hd) e nucleotídica (π), distância genética (p não corrigida) média e máxima, coeficiente de determinação (r^2) e valor de significância (p) do teste de Mantel calculados para sequências de CitB e *D-loop* de *Euryzgomatomys spinosus*.

marcador	Hd	π	distância genética (%)		Teste de Mantel	
			média	máxima	r^2	p
CitB	0,9312	0,01243	$1,2 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,5$	0,65	0,001996
<i>D-loop</i>	0,9656	0,02028	$2,0 \pm 0,4$	$4,5 \pm 0,9$	0,75	0,0001

As redes de haplótipos de CitB e *D-loop* (Figura 3) mostraram relações semelhantes. Para o CitB, quatro haplótipos foram compartilhados entre diferentes localidades (Hc2, Hc9, Hc10 e Hc11) e os haplótipos mais frequentes foram Hc9, Hc10 e Hc11, cada um deles registrado 5 vezes. Para o *D-loop* dois haplótipos foram compartilhados entre diferentes localidades (Hd7 e Hd15) e o haplótipo mais frequentes foi Hd15, registrado 4 vezes.

Tabela 2. Lista de haplótipos de *Euryzgomatomys spinosus* de CitB e *D-loop*, por localidade, indicando o número de indivíduos amostrados em cada localidade (n), identificação do haplótipo (H) e o voucher correspondente. As localidades estão identificadas de acordo com a Figura 1. Nomes com asteriscos (*) indicam amostras das quais o material foi extraído da pele e estão disponíveis apenas 417 pb de CitB para comparação.

ID loc.	CitB			<i>D-loop</i>		
	n	H	voucher	n	H	voucher
5	1	Hc2	CMUFV 2209	1	Hd4	CMUFV 2209
6	1	Hc3	MCNM 2265*	–	–	–
8	2	Hc1	UFMG 1948, 1949	2	Hd1	UFMG 1948, 1949
9	1	Hc2	MDIA 078	–	–	–
12	1	Hc4	UFES 835*	–	–	–
17	1	Hc7	SU 73	1	Hd3	SU 73
24	2	Hc5	UNIBAN 2592	1	Hd2	UNIBAN 2592
		Hc6	UNIBAN 2639	–	–	–
28	1	Hc8	ITM 287	1	Hd16	
43	1	Hc13	JC 2894	1	Hd18	
47	1	Hc14	UFSC 4840	–	–	–
50	6	Hc9	FURB 751, 5205	1	Hd15	FURB 5205
		Hc10	FURB 6455, 6504	1	Hd14	FURB 751
		Hc11	FURB 5238, 6555	1	Hd13	FURB 798
				2	Hd9	FURB 6455, 6504
				2	Hd6	FURB 5238, 6555
51	2	Hc10	FURB 12348, 18160	1	Hd8	FURB 12348
				1	Hd12	FURB 18160
52	8	Hc9	FURB 9241, 9300, 9301	3	Hd15	FURB 9251, 9300, 9301
		Hc10	FURB 9249	2	Hd10	FURB 9248, 9249
		Hc11	FURB 9321, 9295	2	Hd7	FURB 9295, 9231
				1	Hd11	FURB 9325
54	2	Hc11	AUC 5186	1	Hd7	AUC 5186
		Hc12	AUC 5183	1	Hd5	AUC 5183
55	1	Hc15	LCEM 129	1	Hd19	LCEM 129
64	1	Hc17	MLP 16VII0211*	–	–	–
73	1	Hc16	TK 66002	1	Hd17	TK 66002

Os valores de F_{ST} foram 0,72 para o CitB e 0,42 para o *D-loop* ($p < 0,0001$), indicando uma grande diferenciação genética entre as populações, principalmente de CitB. A subdivisão das localidades de coleta em 2 populações, uma ao sul e outra ao norte (Figuras 3 e 4) foi o cenário ótimo levando em conta a concordância entre as estruturas resultantes para os dois marcadores e a formação de grupamentos com mais de uma localidade (ver detalhes das análises

no Apêndice 4). Os valores de F_{CT} calculados para a subdivisão sugerida foi 0,45 para o CitB e 0,48 para o *D-loop* ($p < 0,0001$). Para o cenário com duas subpopulações, 45 % da variância total encontrada para o CitB está entre as subpopulações, 34 % entre localidades dentro das subpopulações e os 21% restantes dentro das localidades. Para o *D-loop*, 48 % está entre as subpopulações, 12 % entre localidades dentro das subpopulações e os 40 % restantes dentro das localidades.

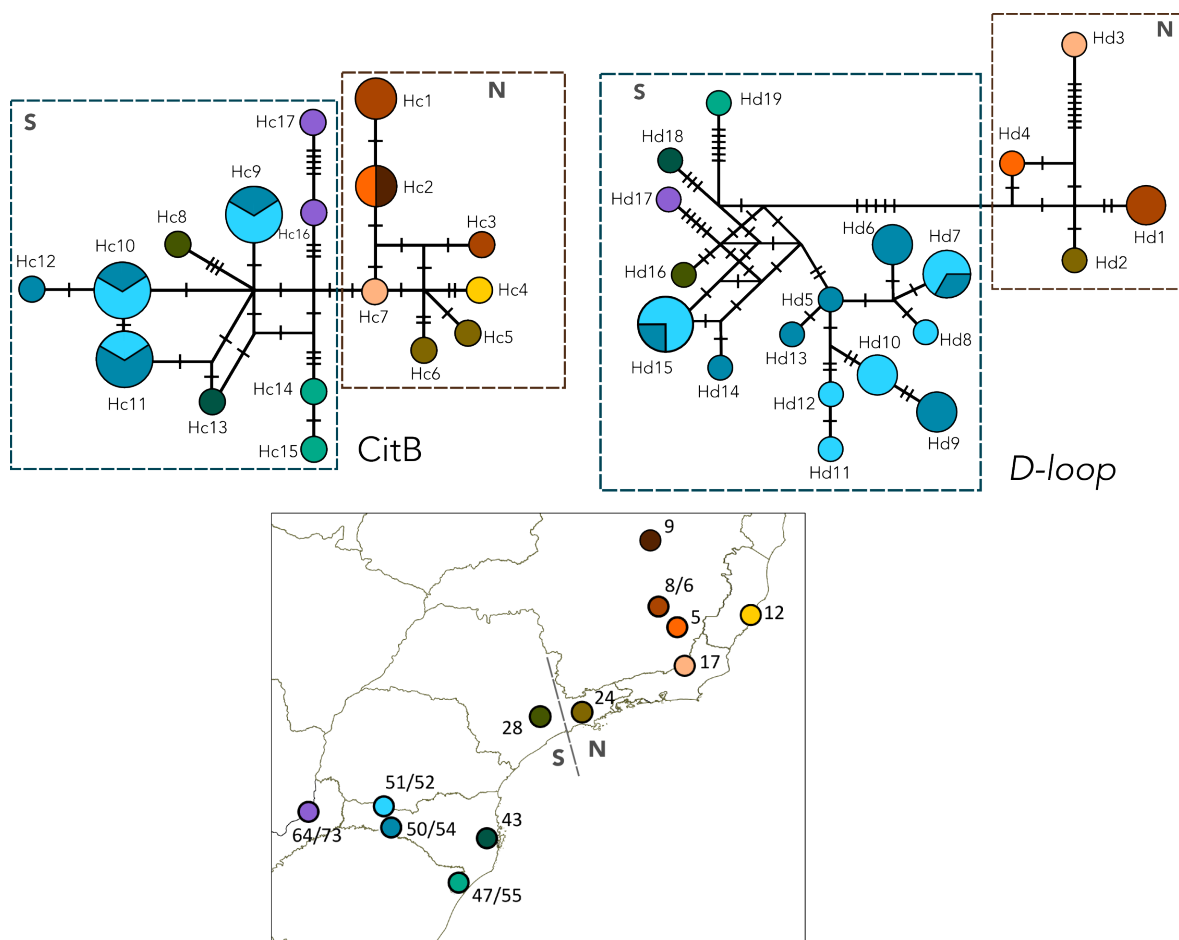


Figura 3. Redes de haplótipos de CitB de *Euryzgomatomys spinosus*, cada círculo representa um haplótipo diferente e seu tamanho é proporcional à frequência amostrada. Cada cor representa uma localidade de coleta, de acordo com o mapa e Tabela 2. O mapa mostra a distribuição das localidades de coleta em duas subpopulações (N = norte e S = sul).

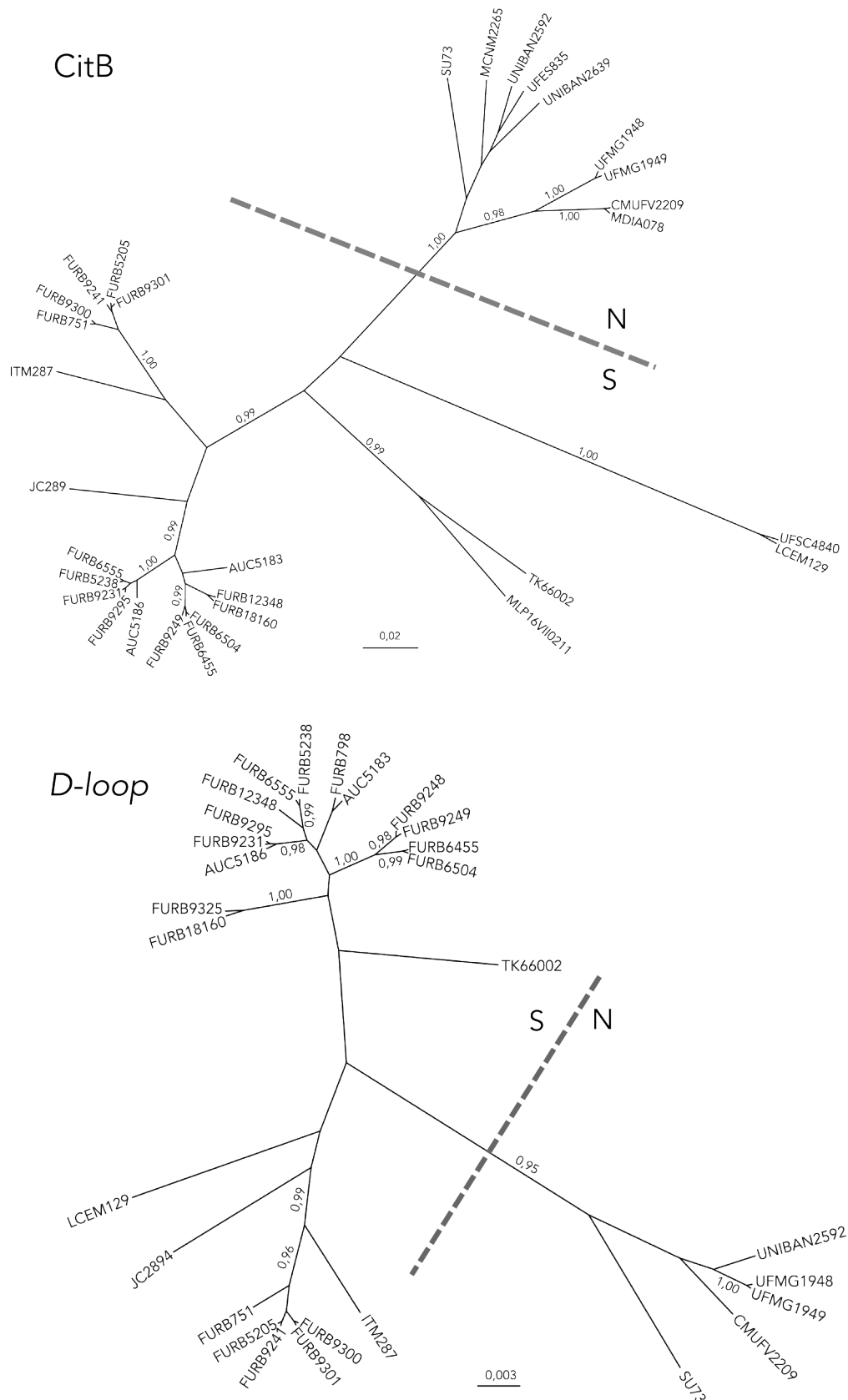


Figura 4. Árvores de coalescência geradas para amostras de CitB e D-loop de *Euryzgomatomys spinosus*. Linhas pontilhada indica divisão em subpopulações de acordo com SAMOVA, sendo N para as localidades mais ao norte e S para aquelas mais ao sul da distribuição.

As árvores de coalescência dos dois marcadores apresentaram a mesma topologia e concordantes com a estruturação em duas subpopulações (Figura 4). A mediana da taxa de evolução calculada para o CitB foi 0,08 mutações por sítio por milhão de anos (Apêndice 2). O tempo médio de coalescência calculados entre todas os haplótipos de CitB foi 138 mil anos com intervalo de confiança de 95 % (IC 95 %) entre 96 e 184 mil anos. Para os haplótipos da subpopulação do norte, o tempo de coalescência foi estimado em 120 mil anos (IC 95 % = 77–164 mil anos) e para o sul 125 mil anos (IC 95 % = 86–169 mil anos).

4. Discussão

4.1. Distribuição geográfica e ocupação de habitat

Animais que vivem embaixo da terra ou utilizam este substrato como abrigo estão mais protegidos de predadores, mudanças climáticas extremas e estresses de temperatura e umidade (Nevo, 2011). *Euryzygomatomys spinosus* tem ocorrência predominante em áreas florestadas da Mata Atlântica (Bonvicino et al., 2008), mas também foi registrado em outros biomas e habitats, inclusive com ocorrência registrada em áreas de Cerrado (localidade 9, Figura 1; Loss et al., submetido). *Euryzygomatomys spinosus* ocupa também um extenso gradiente altitudinal ao longo da sua distribuição, sendo registrado tanto em terras baixas próximas ao litoral, como nos municípios de Mangaratiba, Rio de Janeiro (localidade 20, Figura 1) e Tapes, Rio Grande do Sul (localidade 56, Figura 1) até elevadas altitudes, como a 2.300 m na Serra do Caparaó, Minas Gerais (localidade 1, Figura 1) e 1.400 m no Itatiaia, Rio de Janeiro (localidade 22, Figura 1).

A espécie ocupa ainda diferentes habitats, sendo registrada em plantações de *Pinus* (Gonçalves et al., 2007), floresta montana (Bonvicino et al., 1997; Geise

et al., 2004), floresta sub-montana (Bueno, 2008; Abreu-Júnior, 2013), capoeiras (Lessa et al., 1999; Scheibler & Christoff, 2007), capão de mata em campo rupestre (Loss et al., submetido), brejos (Stallings, 1989) e próxima a cultivos agrícolas (D'Andrea et al., 2007; Pinto et al., 2009). O hábito semi-fossorial pode favorecer a ocupação de diferentes ambientes pela espécie, que portanto pode ser considerada generalista na ocupação do habitat.

Com exceção da localidade Salto do Pirapora, estado de São Paulo (Figura 1, localidade 30), onde foram registrados 44 exemplares de *E. spinosus*, todos os demais registros foram de no máximo 8 indivíduos por localidade, sendo que em pelo menos 33 localidades apenas um indivíduo foi registrado. No entanto, não é possível determinar se esses valores refletem um baixo número populacional ou métodos pouco eficientes de captura por se tratar de uma espécie semi-fossorial.

As análises de modelagem de nicho sugerem que há 21 mil anos as áreas mais adequadas para *E. spinosus* estariam deslocadas cerca de 1.500 km ao norte. No entanto, os valores de adequabilidades dos modelos, principalmente no presente e há 120 mil anos atrás são baixos, indicando que as variáveis ambientais utilizadas na modelagem não são eficientes para predizer a distribuição da espécie. Em se tratando de uma espécie semi-fossorial, que está de certa forma tamponada em relação às mudanças ambientais (incluindo as climáticas) devido ao seu hábito de vida, é esperado que as variáveis climáticas influenciem menos a sua ocorrência e consequentemente, sejam pouco informativas na construção dos modelos de nicho ecológico. A distribuição de roedores fossoriais está fortemente associada a distribuição de solos adequados (Steinberg & Patton, 2000), que podem influenciar não apenas a distribuição de espécies com esse hábito mas também a capacidade de dispersão para acessar novas áreas adequadas (Stockman et al., 2006; Encarnación-Luévano et al., 2013). Variáveis relacionadas à estrutura do solo podem ser mais informativas para predizer a distribuição de espécies associadas a tipos específicos de terrenos do que as climáticas (e.g., Edwards et al., 2012).

Devido a baixa adequabilidade dos modelos é temerária a associação de mudanças climáticas passadas à estrutura genética observada e possíveis mudanças demográficas. No entanto, fósseis de *Euryzygomatomys* sp. foram registrados na Toca da Boa Vista (Figura 2), município de Campo Formoso, na Bahia (Dutra, 2012). Os fósseis não foram datados, mas estudos de datações com séries de Urânio na mesma região sugerem que os depósitos da Toca da Boa Vista variem entre 255 e 20 mil anos atrás (Auler et al., 2006). Essa localidade está próxima da área adequada estimada para ocorrência de *E. spinosus* no modelo de 21 mil anos atrás e se encontra a cerca de mil quilômetros a norte do extremo norte da distribuição atual da espécie.

Winge (1888) descreveu a espécie fóssil *Euryzygomatomys mordax* de Lagoa Santa, no estado de Minas Gerais, e os depósitos dessa região variam entre 10 e 360 mil anos (Auler et al., 2006). Hadler et al. (2008) registraram a mesma espécie no sítio de Garivaldino, estado do Rio Grande do Sul, no Holoceno, entre 7 e 9 mil anos atrás. Levando em conta também o fóssil registrado na Bahia, é possível que o gênero *Euryzygomatomys* tenha tido uma distribuição muito mais ampla no passado, ocupando uma área desde a Bahia até o Rio Grande do Sul, sugerindo que mudanças climáticas registradas no Pleistoceno podem ter tido um efeito menor na distribuição do gênero devido aos hábitos semifossoriais e generalistas quando comparado a espécies arborícolas e dependentes de florestas, como *Callistomys* e *Phyllomys* (Capítulos 1 e 2).

Marshall & Sempere (1991) citaram o fóssil *Euryzygomatomys hoffstetteri*, para o Pleistoceno do sítio de Tarija, na Bolívia, mas como esse nome só aparece em listas de fauna e a espécie nunca foi descrita formalmente, este pode ser considerado um *nomem nudum*. Diego Verzi (com. pess.) analisou o material de Tarija e acredita que não se trata de um *Euryzygomatomys*. Três exemplares tombados na Fundación Miguel Lillo, Tucumán, Argentina (FML 1400, 1401, 1402) provenientes do departamento de Beni, na Bolívia, estão identificados

como *Euryzygomatomys*, no entanto, M. Diaz (com. pess.) analisou o material e acredita se tratar de exemplares de *Proechimys*, portanto não há registro confirmado do gênero na Bolívia, nem no registro fóssil, nem para ocorrência atual.

4.2. Variação genética e sistemática molecular

Devido a baixa capacidade de dispersão, roedores subterrâneos geralmente estão distribuídos em muitas populações relativamente pequenas ao invés de populações grandes e panmíticas com distribuição contínua (Steinberg & Patton, 2000). Essa tendência leva a forte estruturação geográfica, logo uma porção substancial da variação dos caracteres, sejam eles morfológicos, cromossômicos ou genéticos, está distribuída entre populações ao invés de se apresentar polimórfica dentro delas (e.g. Gonçalves & Freitas, 2009; Mora et al., 2013). Foi possível detectar uma elevada diversidade haplotípica e nucleotídica (Tabela 1) tanto para o CitB quanto para o *D-loop*, mesmo com um número limitado de indivíduos e localidades amostradas. A estruturação geográfica é substancial (Figura 2) e grande parte da divergência genética entre os haplótipos pode ser explicada pela distância geográfica, como esperado para roedores fossoriais e semi-fossoriais (Steinberg & Patton, 2000).

A inclusão nas análises genéticas de amostras distribuídas ao longo da ocorrência de *Euryzygomatomys* e em regiões próximas às localidades tipo da espécie (Atyra, Paraguai), assim como dos outros dois nomes associados ao gênero, *E. cattelus* (Joinville, Santa Catarina) e *E. guiara* (Ipanema, São Paulo), permite testar a classificação atual. Apesar da estruturação entre as localidades, a divergência genética entre os haplótipos é baixa e há isolamento por distância, corroborando a classificação atual da existência de apenas uma espécie vivente no gênero, *Euryzygomatomys spinosus*.

A baixa divergência genética entre os haplótipos indica um processo de estruturação recente. A estimativa média do tempo de coalescência para todos

os haplótipos do marcador mitocondrial CitB foi 140 mil anos, sugerindo que as linhagens viventes se diversificaram no final do Pleistoceno. *Euryzygomatomys spinosus* está estruturado em duas subpopulações, uma ao norte e outra ao sul, que se aproximam no nordeste do estado de São Paulo (Figura 2). A inclusão de mais amostras e localidades nas análises, principalmente próximas à região de encontro das duas subpopulações no estado de São Paulo, poderá auxiliar no refinamento da estruturação genética encontrada.

5. Conclusões

Euryzygomatomys spinosus apresenta distribuição em áreas de Mata Atlântica e adjacências ao sul do Rio Doce, no Brasil, Paraguai e Argentina, incluindo um registro confirmado no Cerrado. Ocorrências equivocadas foram registradas no Mato Grosso, Brasil e Beni, Bolívia, no entanto esses registros se referem respectivamente a *Carterodon* e *Proechimys*. Sua distribuição passada pode ter sido mais extensa, atingindo áreas cerca de mil quilômetros a norte da observada atualmente. A espécie ocupa habitats muito diversos e pode ser considerada generalista.

As populações de *Euryzygomatomys spinosus* são geneticamente estruturadas ao longo da sua distribuição com evidências de isolamento por distância. A divergência genética mitocondrial encontrada é relativamente baixa, sugerindo uma estruturação recente, estimada para o final do Pleistoceno (cerca de 140 mil anos atrás). A população está subdivida em dois grupos, um mais ao norte da distribuição e outro mais ao sul, a partir da região centro-leste do estado de São Paulo. Resultados genéticos corroboram a taxonomia atual que considera apenas uma espécie, *E. spinosus*, para o gênero.

6. Referências

- Abreu-Júnior E.F. (2013) *Pequenos mamíferos não voadores da Estação Ecológica de Bananal, SP*. Dissertação de mestrado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz," São Paulo.
- Antoine P.-O., Marivaux L., Croft D. a, Billet G., Ganerød M., Jaramillo C., Martin T., Orliac M.J., Tejada J., Altamirano A.J., Duranthon F., Fanjat G., Rousse S., & Gismondi R.S. (2012) Middle Eocene rodents from Peruvian Amazonia reveal the pattern and timing of caviomorph origins and biogeography. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences*, **279**, 1319–1326.
- Auler A.S., Piló L.B., Smart P.L., Wang X., Hoffmann D., Richards D.A., Edwards R.L., Neves W.A., & Cheng H. (2006) U-series dating and taphonomy of Quaternary vertebrates from Brazilian caves. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **240**, 508–522.
- Bandelt H.-J., Foster P., & Röhl A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 37–48.
- Bezerra A.M.R., Marinho-filho J., & Carmignotto A.P. (2011) A Review of the Distribution, Morphometrics, and Habit of Owl's Spiny Rat *Carterodon sulcidens* (Lund, 1841) (Rodentia: Echimyidae). *Zoological Studies*, **50**, 566–576.
- Bi K., Linderroth T., Vanderpool D., Good J.M., Nielsen R., & Moritz C. (2013) Unlocking the vault: next-generation museum population genomics. *Molecular Ecology*, **22**, 6018–6032.
- Bonvicino C.R., Langguth A., Lindbergh S.M., & de Paula A.C. (1997) An elevation gradient study of small mammals at Caparaó National Park, south eastern Brazil. *Mammalia*, **61**, 547–560.
- Bonvicino C.R., Lindbergh S.M., & Maroja L.S. (2002) Small non-flying mammals from conserved and altered areas of Atlantic Forest and Cerrado: comments on their potential use for monitoring environment. *Brazilian Journal of Biology*, **62**, 765–774.
- Bonvicino C.R., de Oliveira J.A., & D'Andrea P.S. (2008) *Guia de roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos*. Centro Pan-Americano de Febre Aftosa, Rio de Janeiro.
- Bruford M.W., Hanotte O., Brookfield J.F.Y., & Burke T. (1992) Single-locus and DNA fingerprinting. *Molecular Genetic Analyses of Populations: a Pratical Approach* (ed. by A.R. Hoelzel), pp. 225–269. IRL Press, Oxford.

- Bueno A. de A. (2008) *Pequenos mamíferos da Mata Atlântica do Planalto Atlântico paulista: uma avaliação da ameaça de extinção e da resposta a alterações no contexto e tamanho dos remanescentes*. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Cabrera A. (1961) Catálogo de los mamíferos de América del Sur. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia,"* **4**, 309–732.
- Catzefflis F., Patton J.L., Percequillo A.R., Bonvicino C.R., & Weksler M. (2008) *Euryzygomatomys spinosus*. *The IUCN Red List of Threatened Species*.
- Chu Y.-K., Owen R.D., Gonzalez L.M., & Jonsson C.B. (2003) The complex ecology of hantavirus in Paraguay. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **69**, 263–268.
- Cirignoli S., Galliari C.A., Pardiñas U.F.J., Podestá D.H., & Abramson R. (2011) Mamíferos de la Reserva Valle del Cuña Pirú, Misiones, Argentina. *Mastozoología Neotropical*, **18**, 25–43.
- D'Andrea P.S., Gentile R., Maroja L.S., Fernandes F.A., Coura R., & Cerqueira R. (2007) Small Mammal Populations of an Agroecosystem in the Atlantic Forest Domain, Southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, **67**, 179–186.
- Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., & Posada D. (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, **9**, 772.
- Douzery E. & Randi E. (1993) The mitochondrial control region of Cervidae: evolutionary patterns and phylogenetic content the left domain. *Molecular Biology and Evolution*, **14**, 1154–1166.
- Dray S. & Dufour A.B. (2007) The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software*, **22**, 1–20.
- Drummond A.J., Suchard M.A., Xie D., & Rambaut A. (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, **29**, 1969–1973.
- Dupanloup I., Schneider S., & Excoffier L. (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, **11**, 2571–2581.
- Dutra R.P. (2012) *Roedores do Quaternário de Minas Gerais e Bahia, Brasil*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

- Edwards D.L., Keogh J.S., & Knowles L.L. (2012) Effects of vicariant barriers, habitat stability, population isolation and environmental features on species divergence in the south-western Australian coastal reptile community. *Molecular Ecology*, **21**, 3809–3822.
- Eisenberg J.F. & Redford K.H. (2000) *Mammals of the Neotropics: The central Neotropics. Volume 3. Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil*. University of Chicago Press, Chicago.
- Ellerman J.R. (1940) *The Families and Genera of Living Rodents. Volume 1: Rodents Other than Muridae*. Briths Museum, London.
- Encarnación-Luévano A., Rojas-Soto O.R., & Sigala-Rodríguez J.J. (2013) Activity response to climate seasonality in species with fossorial habits: a niche modeling approach using the lowland burrowing treefrog (*Smilisca fodiens*). *PloS one*, **8**, e78290.
- Excoffier L., Laval G., & Schneider S. (2005) Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, **1**, 47–50.
- Fabre P.-H., Galewski T., Tilak M., & Douzery E.J.P. (2013) Diversification of South American spiny rats (Echimyidae): a multigene phylogenetic approach. *Zoologica Scripta*, **42**, 117–134.
- Galewski T., Mauffrey J.-F., Leite Y.L.R., Patton J.L., & Douzery E.J.P. (2005) Ecomorphological diversification among South American spiny rats (Rodentia; Echimyidae): a phylogenetic and chronological approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **34**, 601–615.
- Geise L., Pereira L.G., Bossi D.E.P., & Bergallo H.G. (2004) Pattern of elevational distribution and richness of non volant mammals in Itatiaia National Park and its surroundings, in southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, **64**, 599–612.
- Gonçalves G.L., Faria-correa M.A., Cunha A.S., & Freitas T.R.O. (2007) Bark consumpition by the spiny rat *Euryzygomatomys spinosus* (G. Fischer) (Echimyidae) on a *Pinus taeda* Linnaeus (Pinacea) plantation in South Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, **24**, 260–263.
- Gonçalves G.L. & Freitas T.R.O. (2009) Intraspecific variation and genetic differentiation of the collared tuco-tuco (*Ctenomys torquatus*) in Southern Brazil. *Journal of Mammalogy*, **90**, 1020–1031.

- Hadler P., Verzi D.H., Vucetich M.G., Ferigolo J., & Ribeiro A.M. (2008) Caviomorphs (Mammalia, Rodentia) from the Holocene of Rio Grande do Sul state, Brazil: systematics and paleoenvironmental context. *Revista Brasileira de Paleontologia*, **11**, 97–116.
- Lacher T.E. & Alho C.J.R. (2001) Terrestrial small mammal richness and habitat associations in an Amazon Forest-Cerrado contact zone. *Biotropica*, **33**, 171–181.
- Lessa G., Gonçalves P.R., Morais-Júnior M.M., Costa F.M., Pereira R.F., & Paglia A.P. (1999) Caracterização e monitoramento da fauna de pequenos mamíferos terrestres de um fragmento de mata secundária em Viçosa, Minas Gerais. *Bios: Cadernos do Departamento de Ciências Biológicas e do Programa de Pós-Graduação em Zoologia de Vertebrados*, **7**, 41–49.
- Librado P. & Rozas J. (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**, 1451–1542.
- Loss A.C., Moura R.T., & Leite Y.L.R. (2014) Unexpected phylogenetic relationships of the painted tree rat *Callistomys pictus* (Rodentia: Echimyidae). *Natureza on Line*, **12**, 132–136.
- Loss A.C., Pacheco M.A.C., Leite Y.L.R., Caldara-Junior V. & Lessa, L.G. Range extension and first record of *Euryzygomatomys spinosus* (Rodentia, Echimyidae) in the Brazilian Cerrado. *Check List* (submitted).
- Marshall L.G. & Sempere T. (1991) The Eocene to Pleistocene vertebrates of Bolivia and their stratigraphic context: a review. *Revista Técnica de Yacimientos Petrolíferos Fiscales Bolivianos*, **12**, 631–652.
- Moojen J. (1952) *Os Roedores do Brasil*. Instituto Nacional do Livro, Rio de Janeiro.
- Mora M.S., Cutrera A.P., Lessa E.P., Vassallo A.I., D'Anatro A., & Mapelli F.J. (2013) Phylogeography and population genetic structure of the Talas tuco-tuco (*Ctenomys talarum*): integrating demographic and habitat histories. *Journal of Mammalogy*, **94**, 459–476.
- Nevo E. (2011) Evolution under environmental stress at macro- and micro-scales. *Genome Biology and Evolution*, **3**, 1039–1052.
- Olivares A.I. & Verzi D.H. (2014) Systematics, phylogeny and evolutionary pattern of the hystricognath rodent *Eumysops* (Echimyidae) from the Plio–Pleistocene of southern South America. *Historical Biology: an International Journal of Paleobiology*, 1–20.

- Paglia A.P., Fonseca G.A.B., Rylands A.B., Harrmann G., Aguiar L.M.S., Chiarello A.G., Leite Y.L.R., Costa L.P., Siciliano S., Kierulff M.C.M., Mendes S.L., Tavares V.C., Mittermeier R.A., & Patton J.L. (2012) *Annotated checklist of Brazilian mammals. Occasional papers in conservation biology, n° 6*. Conservation International, Arlington.
- Phillips S.J., Anderson R.P., & Schapire R.E. (2006) Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling*, **190**, 231–259.
- Pinto I.S., Loss A.C.C., Falqueto A., & Leite Y.L.R. (2009) Pequenos mamíferos não voadores em fragmentos de Mata Atlântica e áreas agrícolas em Viana, Espírito Santo, Brasil. *Biota Neotropica*, **9**, 1–6.
- Santos-Filho M., Frieiro-Costa F., Ignácio Á., & Silva M. (2012) Use of habitats by non-volant small mammals in Cerrado in Central Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, **72**, 893–902.
- Scheibler D.R. & Christoff A.U. (2007) Habitat associations of small mammals in southern Brazil and use of regurgitated pellets of birds of prey for inventorying a local fauna. *Brazilian Journal of Biology*, **67**, 619–625.
- Smith M.F. & Patton J.L. (1993) The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine tribe. *Biological Journal of the Linnean Society*, **50**, 149–177.
- Stallings J.R. (1989) Small mammal inventories. *Bulletin Florida State Museum*, **34**, 153–200.
- Steinberg E.K. & Patton J.L. (2000) Genetic structure and the geography of speciation in subterranean rodents: opportunities and constraints for evolutionary diversification. *Life underground: the biology of subterranean rodents* (ed. by E.A. Lacey, J.L. Patton, and G.N. Cameron), University of Chicago Press, Chicago.
- Stockman A.K., Beamer D.A., & Bond J.E. (2006) An evaluation of a GARP model as an approach to predicting the spatial distribution of non-vagile invertebrate species. *Diversity and Distributions*, **12**, 81–89.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., & Kumar S. (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, **30**, 2725–2729.
- Upham N.S., Ojala-Barbour R., Brito M.J., Velazco P.M., & Patterson B.D. (2013) Transitions between Andean and Amazonian centers of endemism in the radiation of some arboreal rodents. *BMC Evolutionary Biology*, **13**, 1–24.

- Upham N.S. & Patterson B.D. (2012) Diversification and biogeography of the Neotropical caviomorph lineage Octodontoidea (Rodentia: Hystricognathi). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **63**, 417–29.
- Verzi D.H. (1999) The dental evidence on the differentiation of the ctenomyine rodents (Caviomorpha, Octodontidae, Ctenomyinae). *Acta Theriologica*, **44**, 263–282.
- Verzi D.H. (2008) Phylogeny and adaptive diversity of rodents of the family Ctenomyidae (Caviomorpha): delimiting lineages and genera in the fossil record. *Journal of Zoology*, **274**, 386–394.
- Verzi D.H., Montalvo C.I., & Deschamps C.M. (2008) Biostratigraphy and biochronology of the late Miocene of central Argentina: evidence from rodents and taphonomy. *Geobis*, **44**, 145–155.
- Verzi D.H., Olivares A.I., & Morgan C.C. (2013) Phylogeny, evolutionary patterns and timescale of South American octodontoid rodents. The importance of recognising morphological differentiation in the fossil record. *Acta Palaeontologica Polonica*, .
- Verzi D.H., Vucetich M.G., & Montalvo C.I. (1995) Un nuevo eumysopinae (Rodentia, Echimyidae) del mioceno tardío de la provincia de La pampa y consideraciones sobre la historia de la subfamilia. *Ameghiniana*, **32**, 191–195.
- Vilela R. V, Machado T., Ventura K., Fagundes V., Silva M.J.J., & Yonenaga-Yassuda Y. (2009) The taxonomic status of the endangered thin-spined porcupine, *Chaetomys subspinosus* (Olfers, 1818), based on molecular and karyologic data. *BMC Evolutionary Biology*, **9**, 29.
- Vucetich M.G., Mazzoni M.M., & Pardiñas U.F.J. (1993) Los roedores de la Formación Collón Curá (Mioceno medio), y la Ignimbrita Pilcaniyeu. Cañadón del Tordillo, Neuquen. *Ameghiniana*, **30**, 361–381.
- Winge H. (1888) Jordfundne og nulevende Gnavere (Rodentia) fra Lagoa Santa, Minas Geraes, Brasilien. *E Museo Lundii*, **1**, 1–200.
- Wright S. (1978) *Evolution and the genetics of population, variability within and among natural populations*. University of Chicago Press, Chicago.
- Yonenaga Y. (1975) Karyotypes and chromosome polymorphism in Brazilian rodents. *Caryologia*, **28**, 269–286.

Apêndice 1. Espécimes utilizados para confecção dos mapas de distribuição de *Euryzygomatomys spinosus* e análises moleculares com os marcadores CitB e *D-loop*. Loc é abreviação para localidades de ocorrência. Asterisco (*) indica espécime utilizadas nas análises de relógio molecular, e código entre chaves correspondem ao número de acesso do GenBank. Dois asteriscos (**) indicam espécimens em que o material extraído para análises moleculares foi proveniente de pele.

nº da loc.	localidade específica	Estado/ Departamento/ Provincia	Pais	Latitude	Longitude	Voucher / Referência
1	Terreirão, Alto Caparaó	Minas Gerais	Brasil	-20.4225	-41.8125	Bonvicino et al., 1997
2	Reserva Particular do Patrimônio Natural Mata do Sossego, Simonésia	Minas Gerais	Brasil	-20.0719	-42.0694	UFMG 2246
3	Caratinga	Minas Gerais	Brasil	-19.7897	-42.1392	UFMG 986; MN 24147, 24149
4	Dionísio	Minas Gerais	Brasil	-19.7828	-42.6425	Stallings, 1989
5	Mata do Paraíso, Viçosa	Minas Gerais	Brasil	-20.7500	-42.8833	CMUFV 2209* / Lessa et al., 1999
6	Catas Altas	Minas Gerais	Brasil	-20.0742	-43.3981	MCNM 2265**
7	Boca da Mata, Conceição do Mato Dentro	Minas Gerais	Brasil	-19.0599	-43.4100	MNRJ 13363, 13371, 13419, 1894
8	Parque Nacional do Caraça, Santa Bárbara	Minas Gerais	Brasil	-20.0700	-43.5000	UFMG 1948 [JF297804]*, 1949*
9	PARNA Sempre Vivas, Buenópolis	Minas Gerais	Brasil	-17.9140	-43.7924	MDIA 078 [KM514670]*, 086 / Loss et al., submetido
10	Itabirito	Minas Gerais	Brasil	-20.2592	-43.8333	MCNM 117
11	Passos	Minas Gerais	Brasil	-20.8331	-46.6383	MNRJ 31557
12	Coacas, Viana	Espírito Santo	Brasil	-20.3592	-40.4728	UFES 835** / Pinto et al., 2009
13	Santa Teresa	Espírito Santo	Brasil	-19.9292	-40.6067	MNRJ 31531, 31558, 4029, 6235
14	Serra do Caparaó, Iuna	Espírito Santo	Brasil	-20.3522	-41.8346	AMNH 61834
15	Parque Estadual do Desengano, Campos de Goytacazes	Rio de Janeiro	Brasil	-21.8340	-41.8118	Modesto et al., 2008
16	ReBio Poço das Antas, Silva Jardim	Rio de Janeiro	Brasil	-22.5439	-42.2781	MNRJ 6779, 29409, 29411
17	Sumidouro	Rio de Janeiro	Brasil	-22.0333	-42.6500	SU 73 [U34858]* / D'Andrea et al., 2007
18	Fazenda Boa Fé, Teresópolis	Rio de Janeiro	Brasil	-22.3843	-42.8723	MNRJ 4237, 6777, 6778, FMNH 26636, 26637, 26869
19	Cidade das Meninas, Duque de Caxias	Rio de Janeiro	Brasil	-22.7405	-43.3001	MNRJ 49539, 29423
20	Mangaratiba	Rio de Janeiro	Brasil	-22.9530	-44.1120	MNRJ 50721, 4027
21	Angra dos Reis	Rio de Janeiro	Brasil	-22.9310	-44.4060	MZUSP 6148
22	Maromba, Itatiaia	Rio de Janeiro	Brasil	-22.3281	-44.6033	MZUSP 8078 / Geise et al., 2004
23	Casa Grande, Salesópolis	São Paulo	Brasil	-23.6667	-45.9167	UFMG 143; MNRJ 24152, 24153, 24154; MZUSP 25877

24	Casa Grande, Biritiba Mirim	São Paulo	Brasil	-23.5725	-46.0386	UNIBAN2592*, 2639 [EU544667]*, 2599 / Vilela et al., 2009
25	Condominio Transurb, Itapevi	São Paulo	Brasil	-23.5848	-46.9626	MHNCI 3601, 3604, 4919, 4921, 4922, 4928, 4929
26	Itú	São Paulo	Brasil	-23.2712	-47.2397	MHNCI 3211
27	Limeira	São Paulo	Brasil	-22.5700	-47.4000	MZUSP 6382
28	Piedade	São Paulo	Brasil	-23.7200	-47.4200	ITM 287* / presente estudo
29	Araçoiaba da Serra	São Paulo	Brasil	-23.5000	-47.6200	MZUSP 10199
30	Salto de Pirapora	São Paulo	Brasil	-23.7200	-47.6200	MZUSP 10755, 25877, 26482, 26556–80, 26580, 26583–85, 26625–38, 26704.
31	Fazenda Primeiro Morro, Sete Barras	São Paulo	Brasil	-24.3333	-47.8167	FMNH 94353-57
33	Itapetininga	São Paulo	Brasil	-23.5800	-48.0500	MNRJ 31560, 24150
34	Fazenda Paraíso, Ribeirão Grande	São Paulo	Brasil	-24.2277	-48.3880	AB 406 / R. Pardini (com. pers.)
35	Boracéia	São Paulo	Brasil	-22.1257	-48.7793	MZUSP 9803, 10036, 25876, 24875, 10821, 10755
36	Adrianópolis	Paraná	Brasil	-24.7954	-48.8389	MZUSP 27887
37	Bacia do rio Tibagi, Telêmaco Borba	Paraná	Brasil	-24.6389	-50.2147	Peracchi et al., 2002
38	KABLIN, Telêmaco Borba	Paraná	Brasil	-24.3207	-50.5946	MHNCI 3758, 1267, 1268
39	Serra da Prata, Guaratuba	Paraná	Brasil	-25.7903	-48.8069	MHNCI 2422
40	Anhangava, Quatro Barras	Paraná	Brasil	-25.3883	-49.0022	MHNCI 5318
41	UHE Salto Caxias, Flor da Serra, Boa Vista da Aparecida	Paraná	Brasil	-25.4838	-53.3826	MHNCI 4496, 4643, 4834
42	Parque Estadual Serra do Tabuleiro, Caldas da Imperatriz, Santo Amaro da Imperatriz	Santa Catarina	Brasil	-27.6881	-48.7786	UFSC 2779 / Cherem et al., 2011
43	Alto da Boa Vista, Rancho Queimado	Santa Catarina	Brasil	-27.7042	-49.1525	JC 2894* / presente estudo
44	Corupá	Santa Catarina	Brasil	-26.4253	-49.2431	MZUSP 585
45	Rio dos Cedros	Santa Catarina	Brasil	-26.7383	-49.2742	UFSC 941 / Cherem 2004
46	Timbó	Santa Catarina	Brasil	-26.8087	-49.2910	UFSC 4367
47	SC 450, Praia Grande	Santa Catarina	Brasil	-29.1850	-49.9946	UFSC 4840*
48	Seiva Reflorestadora de Pinus, Ponte Alta do Norte	Santa Catarina	Brasil	-27.1672	-50.4503	MHNCI 4402, 4403, 4987, 4988
49	PCH Passos Maia, rio Chapecó, Passos Maia	Santa Catarina	Brasil	-26.6764	-52.0222	UFSC 4839
50	Usina Hidrelétrica de Itá, Itá	Santa Catarina	Brasil	-27.2815	-52.3691	FURB 751*, 798*, 5205*, 5238*, 6455*, 6504*, 6555*
51	PCH Ludesha, São Domingos	Santa Catarina	Brasil	-26.5757	-52.5004	FURB 12348*, 18160*

52	UHEQQ (Usina Hidrelétrica Quebra Queixo, UHE Quebra Queixo), São Domingos	Santa Catarina	Brasil	-26.6521	-52.5470	FURB 9231*, 9241*, 9248*, 9249*, 9295*, 9300*, 9301*, 9395*
53	Itapiranga	Santa Catarina	Brasil	-27.1694	-53.7122	UFSC 073 / Cherem 2004
54	Usina Hidrelétrica de Itá, Aratiba	Rio Grande do	Brasil	-27.3502	-52.3052	AUC 5183*, AUC 5186* / Leite et al., 2008
55	Cambará do Sul	Rio Grande do	Brasil	-29.1667	-50.0833	LCEM 129* / Gonçalves et al., 2007
56	Tapes	Rio Grande do	Brasil	-30.6728	-51.4200	FZB-MCN 2364
57	Cotiporã	Rio Grande do	Brasil	-29.0507	-51.6811	Betat et al., 2011
58	Venâncio Aires	Rio Grande do	Brasil	-29.5833	-52.2000	Scheibler & Christoff 2007
59	Lajeado Grande, Alpestre	Rio Grande do	Brasil	-27.2508	-52.9727	UFSC 4005
60	Reserva Biosfera Yaboti, Guarani	Misiones	Argentina	-27.0763	-54.0253	Chebez, 1996
61	Parque Nacional Iguazu, Iguazu	Misiones	Argentina	-25.7041	-54.3281	MACN-Ma 23656
62	Montecarlo	Misiones	Argentina	-26.6480	-54.7420	Chebez, 1996
63	Cainguas	Misiones	Argentina	-27.1562	-54.8577	Chebez, 1996
64	Misiones	Misiones	Argentina	-27.0881	-54.9525	MLP 16.VII.02.11**
65	Misiones	Misiones	Argentina	-27.1072	-54.9839	CNP 791 / Cirignoli et al 2011
66	San Javier	Misiones	Argentina	-27.8400	-55.1273	Chebez, 1996
67	Obera	Misiones	Argentina	-27.4793	-55.1470	Chebez, 1996
68	Guarani	Misiones	Argentina	-27.5190	-55.1589	CFA 05302, 05802, 06065 / Robles et al., 2012
69	Leandro N. Alem	Misiones	Argentina	-27.5920	-55.3048	Chebez, 1996
70	Candelaria	Misiones	Argentina	-27.4838	-55.4781	MACN-Ma 18103
71	San Ignacio	Misiones	Argentina	-27.2431	-55.5432	Chebez, 1996
73	Itapua	Itapua	Paraguai	-26.5369	-54.8456	TK 66002* / Chu et al., 2003
74	Itapua	Itapua	Paraguai	-26.7589	-55.8731	TK 60949
75	Villarrica	Guaira	Paraguai	-25.7500	-56.4333	AMNH 66785
76	Atyra	Cordillera	Paraguai	-25.3053	-57.1383	Localidade tipo

Siglas das coleções:

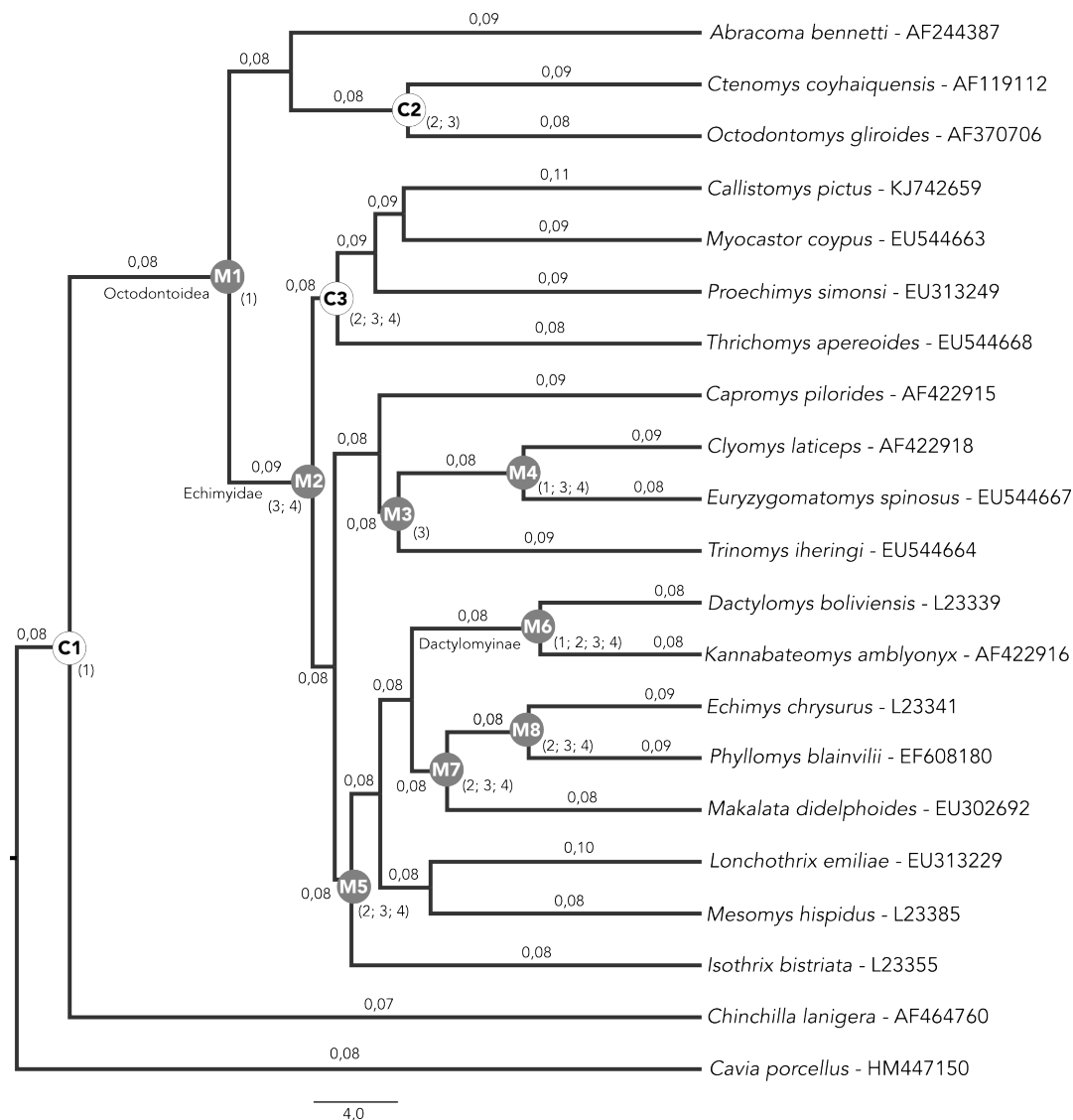
AMNH = American Museum of Natural History, Nova Iorque, EUA; CNP = Centro Nacional Patagónico, Puerto Madryn, Argentina; CMUFV = Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil; FMNH = Field Museum of Natural History, Chicago, EUA; FURB = Coleção Zoológica, Fundação Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, Santa Catarina, Brasil; MACN-Ma = Colección Nacional de Mastozoología, Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia", Buenos Aires, Argentina; MCN-FZB = Museu de Ciências Naturais, Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil; MCNM = Museu de Ciências Naturais, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil; MDIA = Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, Brasil; MHNCI = Museu de História Natural Capão da Imbuia, Curitiba, Brasil; MLP = Museo de La Plata, La Plata, Argentina; MNRJ = Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil; MZUSP = Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil;

TK = The Museum, Texas Tech University, Lubbock, EUA; UFES = Coleção de Mamíferos, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brasil; UFMG = Coleção de Mamíferos do Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil; UFSC = Coleção Científica de Mamíferos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

Material não tombado, iniciais e números de campo referente aos seguintes coletores:

R. Pardini (AB); A. Christoff (AUC); E. Massoia (CFA); J.Charem (JC); P. D'Andrea (SU); G. Gonçalves e T.R.O. Freitas (LCEM); Y. Yonenaga-Yassuda (ITM e UNIBAN).

Apêndice 2. Taxas de evolução em mutação por sítio por milhão de ano calculadas para o Citocromo b de gêneros de Echimyidae. Códigos na frente das espécies correspondem ao acesso do GenBank. Nós utilizados na calibração do relógio molecular estão indicados por C1-C3 e nós em que a monofilia foi forçada para indicar a topologia estão indicados por M1-M8. Números entre parênteses indicam referências utilizadas para posição do nó, que estão listadas abaixo da figura.



¹Upham N.S. & Patterson B.D. (2012) Diversification and biogeography of the Neotropical caviomorph lineage Octodontoidea (Rodentia: Hystricognathi). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **63**, 417–29.

²Upham N.S., Ojala-Barbour R., Brito M J., Velazco P.M., & Patterson B.D. (2013) Transitions between Andean and Amazonian centers of endemism in the radiation of some arboreal rodents. *BMC Evolutionary Biology*, **13**, 1–24.

³Fabre P.-H., Galewski T., Tilak M., & Douzery E.J.P. (2013) Diversification of South American spiny rats (Echimyidae): a multigene phylogenetic approach. *Zoologica Scripta*, **42**, 117–134.

⁴Loss A.C., Moura R.T., & Leite Y.L.R. (2014) Unexpected phylogenetic relationships of the painted tree rat *Callistomys pictus* (Rodentia: Echimyidae). *Natureza on Line*, **12**, 132–136.

Apêndice 3. Descrição das camadas ambientais “BIO” disponíveis no WorldClim (<http://www.worldclim.org>) em novembro de 2013.

BIO1 = Temperatura média anual.

BIO2 = Variação média diurna (média da temperatura mensal (temp. máx – temp. min)).

BIO3 = Isotermalidade ($\text{bio2} / \text{bio7} \times 100$).

BIO4 = Sazonalidade da temperatura ($\text{desvio padrão} \times 100$).

BIO5 = Temperatura máxima no mês mais quente.

BIO6 = Temperatura mínima no mês mais frio.

BIO7 = Variação da temperatura média anual.

BIO8 = Temperatura média do trimestre mais úmido.

BIO9 = Temperatura média do trimestre mais seco.

BIO10 = Temperatura média do trimestre mais quente.

BIO11 = Temperatura média do trimestre mais frio.

BIO12 = Precipitação média anual.

BIO13 = Precipitação média do mês mais úmido.

BIO14 = Precipitação média do mês mais seco.

BIO15 = Sazonalidade da precipitação (coeficiente de variação).

BIO16 = Precipitação média do trimestre mais úmido.

BIO17 = Precipitação média do trimestre mais seco.

BIO18 = Precipitação média do trimestre mais quente.

BIO19 = Precipitação média do trimestre mais frio.

Apêndice 4. Valores de variância entre localidades dentro de população, considerando apenas uma população ($n = 1$) calculado por AMOVA (F_{ST}) e valores de variância entre populações calculados por SAMOVA (F_{CT}) para os marcadores mitocondriais *CitB* e *D-loop* para *Euryzgomatomys spinosus*. Estruturas propostas pela SAMOVA para os dois marcadores para n igual a 2 e 3 estão listadas abaixo.

n grupos	variância entre grupos	
	<i>CitB</i>	<i>D-loop</i>
1	0,72	0,42
2	0,45	0,48
3	0,53	0,53
4	0,63	0,56
5	0,68	0,55
6	0,66	0,55
7	0,70	0,57
8	0,73	0,58
9	0,68	0,55
10	0,78	0,53

CitB

2 populações

Grupo1={"loc28"; "loc43"; "loc47"; "loc50"; "loc51"; "loc52"; "loc54"; "loc55"; "loc64"; "loc73"}

Grupo2={"loc5"; "loc6"; "loc8"; "loc9"; "loc12"; "loc17"; "loc24"}

3 populações

Grupo1={"loc28"; "loc43"; "loc50"; "loc51"; "loc52"; "loc54"; "loc64"; "loc73"}

Grupo2={"loc5"; "loc6"; "loc8"; "loc9"; "loc12"; "loc17"; "loc24"}

Grupo3={"loc47"; "loc55"}

D-loop

2 populações

Grupo1={"loc28"; "loc43"; "loc50"; "loc51"; "loc52"; "loc54"; "loc55"; "loc73"}

Grupo2={"loc5"; "loc8"; "loc17"; "loc24"}

3 populações

Grupo1={"loc28"; "loc43"; "loc50"; "loc51"; "loc52"; "loc54"; "loc55"; "loc73"}

Grupo2={"loc5"; "loc8"; "loc24"}

Grupo3={"loc17"}

A estrutura com 3 grupos não é concordante entre os marcadores e portanto o cenário escolhido foi aquele com 2 populações ($n = 2$).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados no presente trabalho reforçam a importância de uma abordagem multidisciplinar para estudos de taxonomia e evolução de organismos antigos e diversos, como os Echimyidae. As sequências de DNA se mostram especialmente úteis como uma fonte primária de informação em casos onde a amostragem disponível é muito pequena e, portanto, insuficiente para permitir comparações morfológicas tradicionais, que geralmente necessitam de uma grande quantidade de espécimes, como na identificação de espécies novas de *Phyllomys*, discutidas no Capítulo 2 ou na avaliação do status taxonômico de *Euryzygomatomys spinosus*, apresentado no Capítulo 3. A utilização de dados moleculares permite ainda confrontar caracteres genéticos e morfológicos, auxiliando a identificação de estados ancestrais e derivados, servindo de alicerces para elaboração de hipóteses sobre a evolução de características morfológicas, ecológicas e comportamentais. Como visto no Capítulo 1, que mostra *Callistomys* como uma linhagem evolutiva distinta dos demais Echimyidae arborícolas, sugerindo que esse hábito evoluiu mais de uma vez na história do grupo. Tais dados também auxiliam no estabelecimento de limites entre variações intra e interespecífica, norteadas por investigações sobre questões como origem da diversidade e da convergência evolutiva. No entanto, essas conclusões só são possíveis quando os dados moleculares são associados a informações de variação morfológica, distribuição geográfica e outras características da biologia das espécies, reforçando a necessidade e importância da prática de uma taxonomia integrativa. Como pode ser evidenciado pela discussão no Capítulo 2 do status taxonômico de *Phyllomys* sp. 6, *P. sulinus* e *P. nigrispinus*.

Outra observação interessante dos resultados aqui apresentados advém da natureza dinâmica da distribuição das espécies ao longo do tempo. Tal dinamismo representa um desafio na reconstituição de cenários evolutivos para a biogeografia histórica uma vez que sugere que as distribuições atuais não

necessariamente refletem a distribuição passada das linhagens. Como observado no Capítulo 1 em relação a linhagens irmãs de *Callistomys* que ocupam habitats bem distintos atualmente. Nesse contexto, a integração de informações de fósseis podem ser essenciais para auxiliar na reconstituição do passado evolutivo, reforçando ainda mais a necessidade de uma abordagem multidisciplinar nos estudos de evolução, como evidenciado no Capítulo 3, pelo registro de um fóssil de *Euryzygomatomys* em áreas em que não há ocorrência atual registrada para o gênero.